ZUR KENNTNIS DER LEUCINFRAKTION DES EIWEISSES

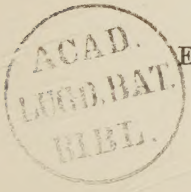
ÜBER DIE SPALTUNG EINIGER RACEMISCHER AMINOSÄUREN MITTELS HEFE

INAUGURAL-DISSERTATION

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

ZUR



ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT VON

ADOLF WENDEL

AUS MAGDEBURG

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN

1908

Referent: Herr Professor Dr. MICHAELIS.

SEINEN LIEBEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

VOM VERFASSER.

Während uns von den drei wichtigen Grundstoffen des tierischen und pflanzlichen Organismus die chemische Zusammensetzung der Fette durch die grundlegenden Untersuchungen Chevreuls und Berthelots, die der Kohlehydrate durch die Arbeiten von E. Fischer heute fast vollständig erschlossen ist, galt die Chemie der Proteine noch vor kurzem als ein für die strukturchemische Forschung vollkommen unzugängliches Gebiet.

Und doch haben gerade die Proteine, die man auch unter dem bekannteren Namen „Eiweißstoffe“ zusammenfaßt, von jeher das größte Interesse gehabt, einmal wegen ihrer großen Verbreitung im tierischen und pflanzlichen Organismus und ferner, weil an ihnen das Leben der Zelle haftet und weil die bisher nur in ihrer geheimnisvollen Wirkung bekannten Träger der Lebenstätigkeit und des Stoffwechsels der Zelle — die Enzyme — wahrscheinlich selbst Eiweißkörper sind.

Daß die chemische Forschung trotz langjähriger eifriger Arbeit zu keinen aufklärenden Resultaten über die Struktur der Proteine gekommen ist, hat seinen Grund zunächst darin, daß die Reindarstellung dieser Substanzen, die von allen natürlich vorkommenden wohl das größte Molekül besitzen, in nur ganz vereinzelten Fällen gelungen war. Es ist daher erklärlich, daß aus diesen meist von physiologischer Seite unternommenen Untersuchungen wenig fruchtbare Folgerungen für die Konstitution der Eiweißkörper zu ziehen waren.

Erst die seit dem Beginn dieses Jahrzehntes einsetzenden Arbeiten E. Fischers zeigen den richtigen Weg, auf dem es voraussichtlich gelingen wird, dieses so ungemein schwierige Gebiet erfolgreich zu bearbeiten. Im Gegensatz zu den meisten früheren physiologischen Forschern, die sich hauptsächlich mit den ersten Abbauprodukten des Eiweißes, den Albumosen und Peptonen, beschäftigt hatten, suchte E. Fischer zunächst zielbewußt die Natur der letzten Spaltungsprodukte des Eiweißmoleküls,

die man recht eigentlich seine Bausteine nennen kann, zu ergründen.

Erhitzt man nämlich irgend einen Eiweißstoff mit Säuren oder Alkalien, so erhält man, wenn man diesen Prozeß, der Hydrolyse genannt wird, lange genug fortsetzt, stets in je nach der Art und Herkunft des Eiweißes wechselnder Menge eine Reihe krystallisierender Substanzen — die Aminosäuren, d. h. chemische Verbindungen, die als Hauptgruppen die Amid- und Carboxylgruppen enthalten. Einzelne dieser Substanzen, die besonders leicht krystallisieren, hatte man als Abbauprodukte des Eiweißes schon früher kennen gelernt. Meist treten sie auf bei der Verdauung in der tierischen Welt durch gewisse Fermente, wie das Trypsin; sie sind ferner erhalten worden durch autolytische Fermente, wie man sie z. B. in der Leber und in der Hefe gefunden hat. Im besonderen sind sie von E. Schulze u. a. bei Keimungsvorgängen der Pflanze und schließlich auch bei tiefer gehenden Zersetzungen, wie bei der Fäulnis, isoliert worden.

Wenn nun auch einzelne Hauptvertreter dieser Verbindungen bei den eben angeführten Prozessen entdeckt und näher studiert worden sind, so hat doch erst E. Fischer ihre Bedeutung für die Chemie des Eiweißes voll erkannt.

Von der Erwägung ausgehend, daß es für die weitere chemische Forschung der Proteine zunächst am wichtigsten ist, diese Bausteine des Eiweißes in ihrer Qualität und Quantität genau nachzuweisen, hat er in seinem Esterverfahren die klassische Methode geschaffen, das Molekül der Eiweißkörper in seine Grundbestandteile zu zerlegen. Mittels dieser Spaltungsmethode gelang zunächst der Nachweis, daß das Eiweiß allgemein aus einer Anzahl Grundkörper sich zusammensetzt, von denen die neueste Forschung jetzt ca. zwanzig isoliert und charakterisiert hat.

Nach dem jetzigen Stande der Wissenschaft stellt E. Fischer[1]) die bisher gefundenen Eiweißspaltungsprodukte in ihrer Gesamtzahl systematisch geordnet folgendermaßen zusammen:

Glykokoll (Braconnot 1820);
Alanin (Schützenberger, Weyl 1888);
Prolin (E. Fischer 1901);
Oxyprolin (E. Fischer 1902);
Ornithin (M. Jaffé 1877);

[1]) E. Fischer, Sitzungsberichte IV der Kgl. preuß. Akademie der Wissenschaften (1907): „Die Chemie der Proteine und ihre Beziehungen zur Biologie."

Valin (v. Gorup-Besanez 1856);
Leucin (Proust 1818, Braconnot 1820);
Isoleucin (F. Ehrlich 1903);
Phenylalanin (E. Schulze und Barrieri 1881);
Serin (Cramer 1865);
Tyrosin (Liebig 1846);
Asparaginsäure (Plisson 1827);
Glutaminsäure (Ritthausen 1866);
Lysin (E. Drechsel 1889);
Arginin (E. Schulze und E. Steiger 1886);
Histidin (A. Koseel 1896);
Tryptophan (Hopkins und Cole 1901);
Diaminotrioxydodekansäure (E. Fischer und E. Abderhalden, Skraup 1904);
Cystin (Wollaston 1810; K. A. H. Mörner 1899).

Mit der Feststellung ihrer Konstitution und den von Fischer und anderen Forschern aufgefundenen Methoden des künstlichen Aufbaues dieser Aminosäuren war die erste Grundlage zur Erkenntnis der inneren Struktur des Eiweißmoleküls gegeben.

Ein weiteres wesentliches Ergebnis dieser Eiweißforschungen ist, daß die meisten dieser Spaltprodukte sich in fast allen Eiweißarten finden, und daß es nur die verschiedenen Mengenverhältnisse der sie zusammensetzenden Aminosäuren sind, welche die Mannigfaltigkeit und die Art der so zahlreichen in der Natur vorkommenden Proteine bedingen.

Nachdem so für die Hauptvertreter der Eiweißgruppe wenigstens im Prinzip die Hauptglieder ihres Körpergerüstes analytisch festgelegt waren, ist E. Fischer weiterhin dazu übergegangen, aus den letzten Bausteinen des Eiweißes, ähnlich den Vorgängen in der Natur, durch Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren höhermolekulare Körper aufzubauen. So gelang es durch Kuppelung zweier Aminosäuren, die Dipeptide zu erhalten, durch weitere Anfügung eines Aminosäurerestes die Tripeptide und weitergehend durch sukzessive Verknüpfung Körper darzustellen, die bis vierzehn Aminosäurereste und mehr enthalten und die nun in allen ihren Eigenschaften und Reaktionen den höhermolekularen Spaltungsprodukten des Eiweißes, den Peptonen, sehr ähnlich sind.

Wenn auch die von Fischer und seinen Mitarbeitern zahlreich ausgeführten Untersuchungen nur als die ersten Schritte zur Aufklärung der Konstitution des Eiweißmoleküls gelten

können, so steht doch zu erwarten, daß der eingeschlagene Weg dereinst zum Ziele führen wird.

Gerade diese so verlockende Aussicht einer künstlichen Eiweißsynthese und die weittragenden Folgerungen, die sich aus einer solchen für die Anschauungen über die Lebensprozesse im tierischen und pflanzlichen Organismus ergeben werden, weisen auf die von E. Fischer so nachdrücklich betonte Notwendigkeit hin, dem chemischen Einzelstudium der Aminosäuren besondere Sorgfalt zuzuwenden. Denn erst nach vollständiger Kenntnis dieser chemischen Verbindungen, die stets das Ausgangsmaterial für eine künstliche Darstellung der Peptide, Polypeptide und anderer Eiweißarten werden bilden müssen, wird es möglich sein, sichere Beweise für den Bau des Eiweißmoleküls zu erhalten.

Das Studium der Eiweißspaltungsprodukte im besonderen bietet nun nach verschiedenen Seiten hin nicht geringe Schwierigkeiten.

Die in früheren Jahren bekannt gewordenen Eiweißabbauprodukte sind meistens solche, die sich leicht aus den ursprünglichen Gemischen direkt krystallinisch oder durch irgend ein Fällungsmittel abscheiden ließen. Daß sie indes zu einem großen Teil unrein waren, hat die Erfahrung am Leucin und Tyrosin gelehrt. Erst durch die Fischersche Methode, die nach Veresterung des Aminosäuregemisches durch fraktionierte Destillation die Abtrennung ganzer Gruppen zuließ, war es möglich, auch die schon früher entdeckten Aminosäuren in größeren Mengen und größerer Reinheit zu erhalten; dennoch gibt sie nach eigenen Angaben E. Fischers in den Ausbeutemengen auch nur Annäherungswerte, und bietet für Aminosäuren, die chemisch einander sehr nahe stehen, keine Möglichkeit der Trennung. Man hat daher durch andere Mittel auf chemischem Wege eine Abscheidung einzelner Aminosäuren zu erreichen gesucht, wobei es oft durch einfache Operationen möglich war, auch neue Aminosäuren aufzufinden, wie u. a. die Entdeckung des Phenylalanins und Arginins durch E. Schulze und des Isoleucins durch F. Ehrlich gezeigt haben.

Wie schwierig es aber war, längst bekannte Spaltkörper des Eiweißes rein zu gewinnen, zeigt als Beispiel das Leucin, das bis heute noch nicht frei von anderen Aminosäuren isoliert worden ist.

Auch bei der synthetischen Darstellung der natürlich vorkommenden Aminosäuren ergeben sich viele Schwierigkeiten, deren wesentlichste darin besteht, daß man genötigt ist, aus den zunächst erhaltenen inaktiven Substanzen die aktiven Aminosäuren darzustellen, da alle Spaltungsprodukte des Eiweißes außer Glykokoll die Polarisationsebene des Lichtes drehen, und für den künstlichen Aufbau des Eiweißmoleküls nur diejenigen Formen Verwendung finden können, die in ihrer sterischen Konfiguration den natürlich vorkommenden entsprechen. Auch hier haben die Fischerschen Untersuchungen gezeigt, wie man zu solchen Verbindungen kommen kann.

Folgende Arbeit, die ich auf Veranlassung des Herrn Privatdozenten Dr. F. Ehrlich unternahm, beabsichtigt nach den eben gekennzeichneten Richtungen hin einen Beitrag zu liefern, einmal zur Kenntnis der häufigsten Vertreter unter den Spaltungsprodukten des Eiweißes, des Leucins, des Isoleucins und Valins, indem sie sowohl versucht, eine neue Trennung und möglichste Reindarstellung dieser drei Körper herbeizuführen, als auch für eine Reihe nicht minder wichtiger synthetisch erhaltener racemischer Aminosäuren ein Verfahren angibt, sie auf einfachem Wege zu spalten.

ZUR KENNTNIS DER LEUCINFRAKTION DES EIWEISSES.

Von allen Eiweißspaltungsprodukten haben naturgemäß diejenigen schon früh das größte Interesse erregt und die eingehendste Bearbeitung erfahren, die sich aus den hydrolytischen Gemischen beim Eindampfen zuerst krystallinisch ausscheiden.

Zu diesen am leichtesten krystallisierenden Aminosäuren gehören vor allem das Tyrosin, Cystin und Leucin, von denen die beiden letzteren schon am Anfang des vorigen Jahrhunderts aufgefunden waren, und deren große Verbreitung in der Natur man früh erkannt hatte. Unter diesen schwerlöslichen Spaltkörpern des Eiweißes hat das Leucin die Aufmerksamkeit der Physiologen und Chemiker besonders auf sich gelenkt. Da die an Irrungen so überaus reiche Geschichte des Leucins für die große Schwierigkeit der speziellen Eiweißforschung so ungemein charakteristisch ist, lohnt es sich wohl, mit einigen Worten darauf einzugehen:

Schon im Jahre 1818 entdeckte Proust[1]) unter den Fäulnisprodukten vom Käse eine Substanz, welche er Käseoxyd nannte; bald darauf fand Braconnot[2]) bei der Zersetzung tierischer Stoffe durch Säuren einen eigentümlichen Körper, den er wegen seines charakteristischen weißen Glanzes mit dem Namen „Leucin" — vom griechischen λευκός silberglänzend hergeleitet — bezeichnete.

Nachdem dann Mulder[3]) 1838 die Identität beider Stoffe nachgewiesen hatte, war das Leucin späterhin fortgesetzt Gegenstand eifriger chemischer und physiologischer Studien, aus denen hervorging, daß diese Aminosäure, die fast stets vom Tyrosin begleitet wird, als typisches Zersetzungsprodukt sämtlicher tierischer

---

[1]) Ann. Chim. phys. **10**, 40.
[2]) Ann. Chim. phys. **13**, 119; **35**, 161.
[3]) Journ. f. prakt. Chem. **16**, 290; **17**, 57.

und pflanzlicher Eiweißkörper auftritt, wenn dieselben der Fäulnis[1]), der Einwirkung von Fermenten[2]) oder der Spaltung mittels verdünnter Säuren[3]) oder Alkalien[4]) unterworfen werden.

Außer seinem verbreiteten natürlichen Vorkommen erkannte man auch bald, daß das Leucin einen der Hauptbestandteile des Eiweißmoleküls bildet. Daß man die Menge dieser Aminosäure im Eiweiß meist zu hoch geschätzt hat, erklärt sich im wesentlichen aus der früher allgemein befolgten Darstellungsweise. Man verfuhr dabei derartig, daß man die durch Einwirkung der Fermente oder Säuren erhaltene Lösung der Aminosäuren aus Eiweiß nach eventueller Entfernung der Säure eindampfte und zur Krystallisation brachte. Aus dem sich hierbei abscheidenden Gemisch, das, wie man damals vermutete, gewöhnlich nur aus Tyrosin und Leucin bestand, wurde dann das schwerlösliche Tyrosin durch Umlösung entfernt und darauf das leichter lösliche Leucin durch Umkrystallisieren gereinigt.

Oft wurden auch nur die vom Tyrosin befreiten Lösungen eingedampft und das rohe Gemisch der sich dabei absetzenden Krystalle mit allen Einschlüssen ihrer Mutterlaugen nach dem Absaugen und Trocknen als „Leucine“ angesprochen. Es kann daher nicht wundernehmen, wenn der Prozentgehalt des Leucins in den früheren Arbeiten beträchtlich zu hoch gefunden wurde, und daß z. B. R. Cohn[5]) die Menge des aus Casein entstehenden Leucins auf 40—50% des angewandten Eiweißkörpers schätzte.

Ein genaueres Bild von den Mengenverhältnissen, in denen Leucin im Eiweiß vorkommt, lieferten erst die in den letzten Jahren von Fischer und seinen Mitarbeitern durchgeführten Eiweißspaltungen mittels der Estermethode. Während bisher meist Rohleucine, die durch anhaftende sirupöse Mutterlaugen verunreinigt waren, isoliert worden waren, gelang es nach dem neuen Verfahren, nunmehr mutterlaugenfreie Substanzen dar-

---

[1]) Proust, Mulder l. c.; Bopp, Annal. d. Chem. **69**, 20; Cahours, Compt. rend. **27**, 265.

[2]) Kühne, Virchows Archiv **39**, 130; Hoppe-Seyler, Lehrb. d. physiol. Chem.; E. Salkowski, Deutsche Klinik 1903.

[3]) Braconnot l. c.; Hlasiwetz und Habermann, Annal. d. Chem. **169**, 150.

[4]) Mulder l. c.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 395.

zustellen. Die von Fischer, Abderhalden und ihren Mitarbeitern an zahlreichen verschiedenen Eiweißkörpern durchgeführten Spaltungen ergaben für die Mehrzahl einen Durchschnittsgehalt von 10%, für einige wenige einen Durchschnittsgehalt von ca. 20% Leucin[1]). Wenn auch die in den erwähnten Untersuchungen angegebenen Ausbeutewerte für Leucin durch die bei der Estermethode unvermeidlichen Verluste in Wirklichkeit nach Angaben von E. Fischer noch etwas höhere sind, so zeigen sie doch deutlich, daß die früheren Schätzungen des Leucingehalts der Eiweißkörper bedeutend zu hoch gegriffen waren.

Auch ergibt sich weiterhin aus diesen Eiweißhydrolysen, daß manche Aminosäuren, wie die Glutaminsäure, gerade in vielen Eiweißkörpern, so z. B. im Casein, überwiegt, von denen man früher angenommen hatte, daß sie hauptsächlich Leucin enthielten. Immerhin lehren aber die Untersuchungen von E. Fischer und Abderhalden, daß wir im Leucin ein sehr wichtiges Eiweißspaltungsprodukt vor uns haben.

Dem Leucin ist ferner deswegen noch eine besondere Bedeutung zuzusprechen, weil es stets mit einer Reihe ihm chemisch nahestehender Substanzen vorkommt, mit denen es früher und auch bei der Fischerschen Estermethode zusammen bestimmt wurde, und über deren Natur erst durch die Untersuchungen der letzten Jahre volle Klarheit geschaffen ist.

Die große Schwierigkeit der Reindarstellung aus dem nach den früheren Verfahren gewonnenen Rohleucin erklären die ehemaligen so vielfach verschiedenen Anschauungen über die Struktur derjenigen Substanz, die wir heute als eigentliches Leucin ansprechen. Man faßte früher unter dem Namen „Leucin" natürlich vorkommende isomere Aminocapronsäuren zusammen, von denen man meistens je nach ihrer Herkunft ohne weiteres annahm, daß sie eine andere Konstitution besäßen.

So stellt bereits Gmelin[2]) gelegentlich der Untersuchung eines Leucins aus Hämoglobin Betrachtungen darüber an, wieviel von den einunddreißig theoretisch möglichen isomeren Verbindungen des Leucins natürlich auftreten.

---

[1]) Der höchste Leucingehalt wurde im Oxyhämoglobin zu 27,82% gefunden.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 21.

Nencki[1]) nimmt an, daß bei der Pankreasverdauung stets nicht ein einziges, sondern eine ganze Reihe von Leucinen sich bilden, und Ähnliches vermutet R. Cohn[2]), der späterhin ebenfalls irrtümlich annahm, eines der hierbei entstehenden Isomeren des Leucins isoliert zu haben.

Als das in der Natur verbreitetste Leucin betrachtete man damals hauptsächlich auf Grund älterer Arbeiten von Limpricht[3]), Hüfner[4]) und Kwisda[5]) die α-Amino-normalcapronsäure, und es kann nicht wundernehmen, daß die Ansichten dieser Forscher, die zum erstenmal eine synthetische Darstellung des Leucins versucht hatten, bis in die letzten Jahre hinein als maßgebend erachtet wurden, und daß noch heute in vielen Lehrbüchern dem Leucin diese Konstitution zugesprochen wird.

Diese sich so vielfach widersprechenden irrtümlichen Anschauungen über das Leucin stellten im wesentlichen erst Schulze und seine Mitarbeiter richtig, deren wichtige Untersuchungen auf dem Gebiete der Keimungsvorgänge in der Pflanze[6]) schon früh auf die Bedeutung des Leucins unter den Aminosäuren des Eiweißes aufmerksam gemacht hatten.

E. Schulze und Likiernik[7]) wiesen im Jahre 1891 nach, daß das durch Erhitzen mit Barythydrat racemisierte natürliche Leucin identisch ist mit der aus Isovaleraldehyd durch die Cyanhydrinreaktion synthetisch erhaltenen α-Amino-isobutyl-Essigsäure:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot COOH\,,$$

und es gelang ihnen auch durch Vergärung dieser racemischen Aminosäure mit Schimmelpilzen den optischen Antipoden des natürlichen Leucins zu gewinnen.

Durch Spaltung des Racemkörpers mittels der Alkaloidsalze

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. N. F. XV, 390—398.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 203.

[3]) Annal. d. Chem. **94**, 243.

[4]) Zeitschr. f. Chem. **1868**, 391.

[5]) Monatsh. f. Chem. **12**, 423.

[6]) Vgl. E. Schulzes zusammenfassende Arbeit: „Über den Abbau und den Aufbau organischer Stickstoffverbindungen in den Pflanzen." Landw. Jahrb. **35**, 621.

[7]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **24**, 669.

ihrer Benzoylverbindungen in beide optisch-aktiven Komponenten gelang dann im Jahre 1900 E. Fischer[1]) die Totalsynthese des Leucins und der vollkommene Nachweis, daß das bisher in den wesentlichsten Mengen nach der Estermethode erhaltene natürliche Leucin mit der in wässeriger Lösung linksdrehenden Modifikation der α-Amino-isobutyl-Essigsäure identisch ist.

Aus den Fischerschen und Schulzeschen Arbeiten ging auch gleichzeitig hervor, daß die bisher vermutete α-Amino-n-capronsäure in der Natur nicht existiert, da die auf analogem Wege aus dem n-Valeraldehyd dargestellte[2]) oder durch Reduktion der d-Glucosaminsäure von C. Neuberg erhaltene[3]) optisch-aktive Substanz von dem natürlichen Leucin gänzlich abweichende Eigenschaften besitzt.

Indes zeigten sich auch jetzt noch merkliche Differenzen zwischen den synthetischen und den verschiedenen aus Eiweiß erhaltenen Leucinpräparaten besonders in der Größe des Drehungsvermögens, die offenbar nur durch Beimengungen dem Leucin sehr nahestehender Verbindungen zu erklären waren.

Konnte man als Ursache der niedrigeren Drehung von Leucin, das durch Säurespaltung des Eiweißes erhalten war, vielleicht eine partielle Racemisierung des ursprünglichen Körpers annehmen, so blieb doch immer noch die höhere Drehung mancher Leucine aufzuklären, deren abweichende Eigenschaften immer wieder die früher vielfach behauptete, aber in keinem Fall exakt bewiesene Existenz isomerer Leucine möglich erscheinen ließen.

Unter den Substanzen, die das Leucin in fast allen Eiweißstoffen begleiten und sich fast stets zusammen mit ihm krystallisiert ausscheiden, ist schon früh die Aminovaleriansäure bekannt geworden, die zuerst E. Schulze[4]) und seine Mitarbeiter in den Keimpflanzen beobachtet und in einzelnen Fällen bereits fast rein daraus dargestellt haben. Eine mit dieser Aminosäure identische Verbindung konnten dann E. Fischer und seine Mitarbeiter beinahe aus allen bisher untersuchten Eiweißarten als einen regel-

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2370, 1900.

[2]) E. Schulze und Likiernik, Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**, 523; E. Fischer und Hagenbach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**, 3764, 1901. E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2381, 1900.

[3]) C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 4015, 1902.

[4]) E. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 300.

mäßigen Bestandteil der bei der Estermethode erhaltenen Leucinfraktion nachweisen. Wie E. Fischer gezeigt hat, ist gerade diese von ihm später mit dem Namen „Valin" belegte Substanz in ganz besonderem Maße befähigt, mit dem Leucin sowohl selbst wie in ihren Derivaten Mischkrystalle zu bilden, deren Trennung bisher eigentlich nur in einem einzigen Falle — beim Horn[1]) — möglich geworden ist, aus dem diese Aminosäure indes auch nur in der Racemform erhalten wurde. Erst neuerdings ist dann ebenfalls E. Fischer die vollständige Synthese des Valins[2]) gelungen, durch die bewiesen wurde, daß die natürlich vorkommende Aminovaleriansäure mit der in wässeriger und salzsaurer Lösung rechtsdrehenden α-Amino-dimethylpropionsäure von der Formel:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!\rangle CH \cdot CHNH_2 \cdot COOH$$

identisch ist.

Verschiedene Anzeichen sprachen nun schon frühzeitig dafür, daß außer der Aminovaleriansäure, die man sowohl bei der direkten Abscheidung wie bei der Isolierung über die Estermethode fast immer im Gemenge mit dem Leucin aus dem Eiweiß erhält, und deren Anwesenheit sich gewöhnlich aus den Zahlen der Elementaranalyse einfach ableitet, noch andere höher drehende Substanzen als Begleiter des natürlichen Leucins in Frage kamen. Sehen wir von den früher bezeichneten Stellen in der Literatur ab, aus denen nicht immer klar zu erfahren war, ob nicht andere mechanische Verunreinigungen die veränderten Eigenschaften des Leucins veranlaßt hatten, so war gerade auf Grund genauerer Kenntnis dieser Aminosäure durch die Forschungen E. Schulzes und E. Fischers doch die Möglichkeit der Existenz eines oder mehrerer Isomerer des Leucins nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen; denn beide Forscher hatten in einzelnen Fällen[3]) tatsächlich Substanzen isolieren können von der gleichen Bruttozusammensetzung, aber von höherem Drehungsvermögen in Salzsäure, wie es das gewöhnliche Leucin aufweist. Sie mußten aber die Frage des Vorhandenseins einer isomeren Aminocapronsäure neben dem Leucin un-

[1]) E. Fischer und Dörpinghaus, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 469.

[2]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2320, 1906.

[3]) E. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**, 534; E. Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 306; E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 161.

entschieden lassen, da weder auf dem Wege über die Kupfersalze noch mittels der Estermethode die Isolierung eines einheitlichen Körpers gelang.

Eine definitive Lösung der Frage nach der Existenz natürlicher Isomerer des Leucins und die vollständige Aufklärung der so vielfach bisher beobachteten Differenzen in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften brachte erst die Entdeckung des Isoleucins durch F. Ehrlich[1]) im Jahre 1903.

Bei der Untersuchung der letzten Abfälle der Zuckerfabrikation, der Strontianentzuckerungslaugen, die hauptsächlich aus Zersetzungsprodukten des Zuckers, der Eiweißsubstanzen und anderer Stoffe der Rübe bestehen, gelang es ihm, aus dem Rohleucin eine Substanz von der Bruttoformel des Leucins zur Abscheidung zu bringen, die in jeder Hinsicht vom Leucin abweichende Eigenschaften besaß. Im Gegensatz zum Leucin, dessen Kupfersalz in Wasser fast unlöslich ist, bildet dieses Isomere ein in Methylalkohol sehr leicht lösliches Kupfersalz, dreht in Salzsäure doppelt so stark wie die bisher bekannte Aminosäure und zeigt in wässeriger Lösung im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Leucinpräparaten deutliche Rechtsdrehung. Ebenso unterschieden sich alle von F. Ehrlich dargestellten Derivate des von ihm „Isoleucin" genannten Körpers im Schmelzpunkt und in der Drehung sehr wesentlich von dem Leucin. Demnach war nunmehr an die Existenz eines natürlichen Isomeren des Leucins nicht mehr zu zweifeln, besonders nachdem es F. Ehrlich gelang, auch aus dem Blutfibrin durch Verdauung mit Pankreas eine identische Substanz zu isolieren, und damit weiterhin den Nachweis zu führen, daß ebenso wie im Leucin in dem Isoleucin ein primäres Eiweißspaltungsprodukt vorliegt.

Mit diesen Ergebnissen der Ehrlichschen Forschung fand auch die Frage, ob etwa noch weitere Isomere des Leucins existieren, ihre vollkommene Erledigung; denn wie die an den verschiedensten Rohleucinen ausgeführten Untersuchungen ergaben, existieren im Eiweiß in der Tat nur zwei isomere Aminocapronsäuren, das Leucin und das Isoleucin. Ihr stetes gemeinsames

---

[1]) Bericht d. V. internationalen Kongresses f. angewandte Chemie, Berlin 1903, **3**, 37; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1809, 1904. Zeitschr. d. Vereins d. Deutschen Zuckerindustrie **54**, Heft 581, 775.

Auftreten und ihre eigentümliche Fähigkeit, miteinander und mit dem ebenso häufig vorkommenden Valin Mischkrystalle zu bilden, erklären besonders bei gleichzeitiger Anwesenheit von racemischem Leucin alle früher beobachteten großen Differenzen der Eigenschaften des vor der Ehrlichschen Entdeckung bekannten Leucins vollkommen.

Schließlich sei noch erwähnt, daß F. Ehrlich[1]) auch die Aufklärung der Konstitution und die Synthese des Isoleucins gelang, derzufolge es die erstbekannte natürliche Aminosäure ist, die zwei asymmetrische Kohlenstoffatome besitzt und mit einer der vier möglichen optisch-aktiven Modifikationen der α-Aminomethyl-äthylpropionsäure von der Formel:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\!\! \overset{*}{C}H \cdot \overset{*}{C}HNH_2 \cdot COOH$$

übereinstimmt.

Fassen wir diese historischen Betrachtungen zusammen, so ergibt sich, daß die sogenannte Leucinfraktion des Eiweißes, wie man sie neben Tyrosin durch direktes Eindampfen der hydrolysierten Lösung oder zwischen bestimmten Siedepunkten bei der Fischerschen Estermethode erhält, sich im wesentlichen aus drei Substanzen zusammensetzt: dem l-Leucin, dem d-Isoleucin und dem d-Valin.

Außer der Bedeutung, welche diese Aminosäuren als wichtige Bestandteile des Proteinmoleküls haben, kommt nun neuerdings noch eine andere hinzu, die eine eingehende chemische Untersuchung dieser Körper noch lohnender erscheinen läßt. Die neueren Arbeiten F. Ehrlichs[2]) haben nämlich gezeigt, daß die Hauptkomponenten des bei jeder Gärung auftretenden Fuselöls, der inaktive Isoamylalkohol, der optisch-aktive Amylalkohol und der Isobutylalkohol, sich aus dem Leucin, Isoleucin und Valin infolge der eiweißaufbauenden Tätigkeit der Hefe gemäß der allgemeinen Gleichung:

$$R \cdot CH(NH_2) \cdot COOH + H_2O = R \cdot CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

bilden.

---

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2538, 1907.

[2]) F. Ehrlich, Zeitschr. d. Vereins d. Deutschen Zuckerindustrie **55**, Heft 592, 539ff.; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1027, 1907.

Diese in vielfacher Hinsicht für die Pflanzenphysiologie wichtigen Untersuchungen ließen von neuem eine eingehende Erforschung der Mengenverhältnisse, in denen die Muttersubstanzen der Alkohole des Fuselöls in den verschiedenen Eiweißstoffen sich vorfinden, besonders wünschenswert erscheinen. Hierfür war es vor allen Dingen erforderlich, nach Methoden zur vollständigen Abtrennung der drei Aminosäuren voneinander zu suchen, da diese fast stets aus allen Eiweißstoffen zunächst im Gemisch erhalten werden, und ihre einzelne Isolierung auch nach den neueren Erfahrungen E. Fischers[1]) durch die Estermethode nur unvollkommen zu erzielen ist.

Vergleicht man nämlich die jetzt nach der Synthese vollständig rein erhaltenen optisch-aktiven Formen dieser drei Aminosäuren mit den aus Eiweiß dargestellten, so zeigen sich immer noch so beträchtliche Unterschiede in der Drehung, daß von den Präparaten, die aus Eiweiß gewonnen sind, bisher vielleicht nur für das Isoleucin die Garantie der Reinheit gegeben ist.

So kann heute, nach fast einem Jahrhundert seit einer Entdeckung, die Reindarstellung des Leucins immer noch nicht als gelungen gelten, da auch die reinsten bisher von Schulze erhaltenen Präparate infolge ihrer Beimengungen von Isoleucin andere Drehungswerte zeigen als diejenigen, die durch Spaltung des synthetischen Leucins von E. Fischer[2]) mittels der Benzoyl-, von E. Fischer und Warburg[3]) mittels der Formylverbindungen und von F. Ehrlich[4]) durch Hefespaltung gewonnen sind.

Ähnliches gilt für das Valin, wie bereits früher erwähnt. Daß auch die Reindarstellung des Isoleucins nach den bisher befolgten Methoden aus anderen natürlichen Produkten, außer der Melasseschlempe, so gut wie unmöglich ist, zeigen alle neueren Untersuchungen[5]), aus denen hervorgeht, daß diese Aminosäure aus

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Peptide und Polypeptide 65—67; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 530, 1906.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2370, 1900.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 3997, 1905.

[4]) Diese Zeitschr. **1**, 8, 1906.

[5]) E. Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 38, 1905; Winterstein und Pantanelli, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 61, 1905; Adensamer und Hoernes, Monatsh. f. Chem. **26**, 1217, 1905; Weitzenböck, Monatsh. f. Chem. **27**, 831, 1906. Vgl. auch Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren usw., l. c.; F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2538, 1907.

anderen Eiweißstoffen regelmäßig mit dem Valin zusammen extrahiert wurde, dessen Abtrennung bisher in keiner Weise gelang, da letzteres ein in Methylalkohol ebenso leicht lösliches Kupfersalz bildet wie das Isoleucin.

Angesichts des oben näher erörterten großen Interesses, das eine eingehende Kenntnis dieser drei natürlich vorkommenden Eiweißspaltungsprodukte bietet, unternahm ich es, nach neuen Methoden der Trennung und Reindarstellung dieser drei Aminosäuren aus den verschiedensten Eiweißstoffen zu suchen, deren Ergebnisse im folgenden näher beschrieben werden.

Diese Untersuchungen gliedern sich in folgende Teile:

1. Die zum erstenmal durchgeführte Reindarstellung des natürlichen l-Leucins aus Ovalbumin, Casein und Hefeeiweiß.

2. Die Untersuchung von Melasseschlempen verschiedener Herkunft und verschiedenartiger Eiweißkörper, wie Casein, Horn, Ovalbumin und anderer auf Isoleucin und Valin.

3. Versuch einer neuen Trennungsmethode des Isoleucins und Valins über die Kupfersalze des racemischen Valins und des Gemisches aus dem d-Isoleucin und dem Alloisoleucin.

Reindarstellung von l-Leucin aus Eiweiß.

Vor der Entdeckung des Isoleucins nahm man allgemein an, daß das reinste Leucin aus Eiweiß bisher von Schulze und seinen Mitarbeitern aus pflanzlichem und von Mauthner aus tierischem Eiweiß dargestellt sei; allerdings zeigten sich auch bei ihren Präparaten sehr beträchtliche Unterschiede besonders in der Drehung, die aber von diesen Autoren hauptsächlich auf geringe Änderungen in der Konzentration der zur Lösung benutzten Salzsäure zurückgeführt wurden.

So fanden Schulze und Boßhard[1]) und Schulze und Likiernik[2]) in ziemlicher Übereinstimmung mit Mauthner[3]), der für Leucin aus Casein $[\alpha]_D = +17{,}5°$ in 10proz. Salzsäure beobachtet hatte, für das Leucin aus Conglutin in 19—20proz. Salzsäure $[\alpha]_D = +17{,}3°$, und späterhin E. Schulze und Winterstein[4]) für ein Leucinpräparat aus Vicia Sativa in 24proz. Salzsäure $[\alpha]_D = +18{,}9°$. Demgegenüber zeigte ein neuerdings von E. Schulze aus Eiweißkörpern gewonnenes und sorgfältig gereinigtes Leucin nach den übereinstimmenden Beobachtungen von E. Schulze und E. Fischer[5]) eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20°} = +16{,}9°$ in 20proz. Salzsäure.

Diese Differenzen veranlaßten bereits E. Fischer Zweifel darüber auszusprechen, ob die bisher erhaltenen Leucinpräparate aus Eiweiß wirklich die Garantie absoluter Reinheit besitzen, zumal es ihm bei der Spaltung des racemischen Leucins über die Benzoylverbindungen[6]) ebenso wie später über die Formyl-

---

[1]) E. Schulze und Boßhard, Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 100, 1885.

[2]) E. Schulze und Likiernik, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **26**, 56, 1893.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **7**, 222, 1883.

[4]) E. Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 306.

[5]) E. Fischer und Warburg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 4003, 1905.

[6]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2370, 1900.

verbindungen[1]) immer nur gelungen war, ein aktives Leucin von dem im Durchschnitt viel niedrigeren Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}6^\circ$ zu erhalten. Da es sich hier immerhin noch um eine Beimengung von Racemkörper handeln konnte, so mußte die Frage nach der wirklichen Drehung des reinen aktiven Leucins vorläufig unentschieden bleiben.

Die Arbeiten über das Isoleucin[2]) zeigten dann deutlich, daß nach den bisherigen Verfahren eine Reindarstellung des Leucins aus Eiweiß überhaupt nicht möglich ist, da man weder durch fraktionierte Krystallisation der freien Aminosäure noch des Kupfersalzes trotz seiner Schwerlöslichkeit eine vollständige Abtrennung des Leucins vom Isoleucin durchführen kann. Das gleiche gilt offenbar für die Reinigung des l-Leucins vom d-Valin, das, wie aus den Arbeiten von E. Fischer[3]) und E. Schulze und Winterstein[4]) hervorgeht, ebenfalls in hohem Grade befähigt ist, sowohl mit dem l-Leucin wie mit dem d-Isoleucin durch Umlösen untrennbare Mischkrystalle zu bilden.

Indes ist schon gelegentlich der Untersuchungen des Leucins aus Melasseschlempe der Weg angedeutet worden, der es ermöglicht, die Entmischung der beobachteten molekularen Verbindungen zwischen Leucin, Isoleucin und Valin vorzunehmen. In diesem Falle[5]) ließ sich nämlich ein isoleucinfreies Leucin in der Weise erhalten, daß die freien Aminosäuren zunächst in die Kupfersalze verwandelt und diese erschöpfend mit Methylalkohol extrahiert wurden. Hierbei wird ein großer Teil Isoleucin vom Leucin abgetrennt. Es hinterbleibt aber ein sowohl in Wasser wie in Alkohol unlösliches Gemisch von viel Leucinkupfer und wenig Isoleucinkupfer, aus dem auch bei noch so langem Kochen mit Wasser, Methyl- oder Äthylalkohol das Isoleucinkupfer nicht zu extrahieren ist. Ein weiterer Teil Isoleucinkupfer war dann wieder aus diesem Gemisch abzuscheiden, nachdem die Kupfersalze mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Lösung der Aminosäuren wieder in die Kupfersalze verwandelt waren und diese

[1]) E. Fischer und Warburg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 3997, 1905.

[2]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1809, 1904; **40**, 2538, 1907.

[3]) E. Fischer und Dörpinghaus, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 469.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 38, 1905.

[5]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1835, 1904.

von neuem mit Methylalkohol behandelt wurden. Erst nachdem dieser Prozeß drei- bis viermal fortgesetzt wurde, gelang es sukzessive die Entmischung der beiden Aminosäuren vorzunehmen und isoleucinfreies Leucin zu gewinnen. Da in der Melasseschlempe von vornherein ein Gemenge von racemischem und aktivem Leucin vorliegt, so war es erklärlich, daß sich auf diesem Wege nur ein partiell racemisiertes Leucin gewinnen ließ, dessen Drehungswerte auf die wirkliche Drehung des Leucins aus Eiweiß der Rübe keinen Rückschluß gestattete.

Im folgenden wurde versucht, die früher von F. Ehrlich angegebene Methode auf die bei der Hydrolyse verschiedener Eiweißstoffe erhaltenen Leucinpräparate zu übertragen. Man gelangt dabei in der Tat zu einem Leucin, dessen Drehung in wässeriger und salzsaurer Lösung vollkommen mit dem aus synthetischem Leucin mittels Hefespaltung erhaltenen[1]) übereinstimmt. Auch im übrigen decken sich seine Eigenschaften mit denen des optisch-aktiven Leucins, das früher von Fischer[2]) über die Benzoyl-, von Fischer und Warburg[3]) über die Formylverbindungen, und ferner von Fischer[4]) bei der Verfütterung von racemischem Leucin an ein Kaninchen gewonnen ist, so daß an der Identität aller dieser Präparate nicht mehr zu zweifeln sein dürfte.

Mit der im folgenden beschriebenen Isolierung von Leucin aus Ovalbumin, Casein und Hefeeiweiß kann also die Reindarstellung der im Jahre 1818 entdeckten Aminosäuren aus natürlichen Stoffen in ihrer ursprünglichen aktiven Form zum erstenmal als gelungen gelten.

Wie die Versuche zeigen, war die Ausbeute an reinem l-Leucin stets relativ sehr gering und betrug höchstens 2% des betreffenden Eiweißstoffes. Wenn hierbei entsprechend der Kompliziertheit des Verfahrens sicher auch mechanische Verluste eine Rolle gespielt haben, so läßt sich doch jetzt schon so viel sagen, daß die früheren

---

[1]) F. Ehrlich, Biochem. Zeitschr. **1**, 8, 1906.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2370, 1900.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 3997, 1905.

[4]) Nach den Versuchsbedingungen von Wohlgemuth (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 2064, 1905). Wohlgemuth selbst macht über die Herkunft und die spezifische Drehung seines Leucins keine bestimmten Angaben.

Schätzungen über den Gehalt der natürlichen Proteine an eigentlichem Leucin bedeutend zu hoch gegriffen waren[1]).

l-Leucin aus Ovalbumin.

In eine kochende Mischung von 750 g konzentrierter Schwefelsäure und $1^1/_2$ l Wasser wurden portionsweise 250 g Ovalbumin (Kahlbaum - Berlin) eingetragen und das Ganze am Rückflußkühler 20 Stunden im Sieden erhalten[2]). Die resultierende tiefdunkelbraune Lösung wurde nach Verdünnen mit ungefähr 2 l Wasser zur Entfernung der Schwefelsäure mit etwas weniger als der berechneten Menge festem Barythydrat unter starkem Rühren versetzt, das ausgefällte Bariumsulfat nach längerem Stehen abgesaugt und wiederholt gründlich mit heißem Wasser zur Entfernung der anhaftenden Lösung ausgewaschen. Aus der abgesaugten Lösung wurde die Schwefelsäure genau ausgefällt und dann das Filtrat in großen Porzellanschalen zunächst bis zur Ausscheidung des Tyrosins eingedampft. Nach dem Erkalten wurde vom auskrystallisierten Tyrosin abfiltriert und mehrfach mit kaltem Wasser nachgewaschen. Nach weiterem Eindampfen des Filtrates konnte noch eine geringe Menge Tyrosin abgeschieden werden. Die gesammelten Filtrate und Waschwässer vom Tyrosin, die nur noch schwach die Millonsche Reaktion gaben, wurden nunmehr bis zur Krystallisation eingedampft und das erhaltene Krystallgemenge längere Zeit in einem kühlen Raum aufbewahrt.

Durch Absaugen und Waschen mit 70proz. Alkohol wurden daraus 55 g dunkelbraun gefärbtes rohes Leucin erhalten.

Zur Überführung in das Kupfersalz wurden diese 55 g Rohleucin zunächst in 2 l Wasser gelöst und die Lösung zweimal mit Tierkohle heiß behandelt. Das schwachbraune Filtrat wurde mit überschüssigem Kupfercarbonat einige Zeit gekocht und das ausgeschiedene Kupfersalz zusammen mit den Kupfercarbonatresten abfiltriert und heiß ausgewaschen.

Das abfiltrierte Kupfersalz wurde zusammen mit dem aus dem tiefblauen Filtrat nach dem Eintrocknen und erschöpfenden

---

[1]) Vgl. besonders die Angaben von R. Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 395.

[2]) Nach der Kossel - Kutscherschen Vorschrift, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 168.

Extrahieren mit Methylalkohol unlöslich zurückbleibenden Kupfersalz in Wasser aufgeschwemmt und unter Erwärmen so lange mit Salzsäure versetzt, bis Lösung eintrat.

Aus der kochenden salzsauren Lösung wurde dann mit Schwefelwasserstoff das Kupfer ausgefällt, vom Schwefelkupfer abfiltriert und das Filtrat zur Vertreibung der überschüssigen Salzsäure mehrmals auf dem Wasserbade eingedampft und dann mit Kupfercarbonat in großem Überschuß gekocht. Nach Neutralisation der Salzsäure vollzog sich die Abscheidung der Kupfersalze in ähnlicher Weise wie bei den freien Aminosäuren. Dann wurde ohne abzufiltrieren eingedampft und das Gemisch der Kupfersalze der Leucine mit Kupferchlorid erschöpfend mit Methylalkohol ausgelaugt.

Die getrockneten unlöslich zurückbleibenden Kupfersalze wurden nach Suspension in Wasser unter Kochen direkt mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus dem Filtrat vom Schwefelkupfer ließen sich nach dem Eindampfen 6,8 g bei 105° getrocknetes, schwach gelb gefärbtes Rohprodukt erhalten.

Ein kleiner Teil dieses Rohleucins wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und zur Bestimmung der Drehung in wässeriger Lösung verwandt.

Angewandt: 0,2368 g Substanz. Gesamtgewicht der wässerigen Lösung 11,5725 g. Prozentgehalt 2,04. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: —0,21°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -5{,}05^\circ.$$

Da F. Ehrlich, der den Drehungswert des Leucins in wässeriger Lösung festgelegt hat, für den optischen Antipoden des Leucins $[\alpha]_D^{20^\circ} = +10{,}34^\circ$ beobachtete, enthält also das zweimal wie oben angegeben entmischte Leucin aus Ovalbumin, wie sich aus der niedrigen Drehung schließen läßt, noch Isoleucin ev. auch Valin beigemengt.

Zur weiteren Reinigung wurde daher eine nochmalige Entmischung in der Weise vorgenommen, daß die oben insgesamt erhaltenen 6,8 g des Leucingemisches wieder in die Kupfersalze verwandelt und mit Methylalkohol behandelt wurden, wobei, nach der Blaufärbung des Methylalkohols zu urteilen, deutliche Mengen Isoleucin- und Valinkupfer in Lösung gingen.

Aus dem unlöslich zurückbleibenden Kupfersalz wurden nach

Zersetzung mit Schwefelwasserstoff noch 3,2 g Aminosäure gewonnen, die nunmehr den doppelten Drehungswert in wässeriger Lösung aufwies.

Angewandt: 0,2413 g Substanz. Gesamtgewicht der wässerigen Lösung 12,1482 g. Prozentgehalt 1,98. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: — 0,40°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}1^\circ.$$

Eine zum viertenmal nach demselben Verfahren ausgeführte Entmischung, bei der nur noch eine sehr geringe Menge von methylalkohollöslichem Kupfersalz abzutrennen war, lieferte schließlich 1,6 g Leucin, das umkrystallisiert mit dem d-Leucin F. Ehrlichs[1]) vollkommen übereinstimmende Drehungswerte ergab. Die Gesamtausbeute an reiner Aminosäure betrug 1,1 g.

Für die Analyse und die Bestimmung der Drehung wurde die aus verdünntem Alkohol umkrystallisierte Substanz bei 110° getrocknet. Schmelzpunkt im geschlossenen Rohr: 295°. 1 Teil Substanz erforderte zur Lösung 45 Teile Wasser von 20° C

0,1558 g Substanz: 0,3126 g CO_2, 0,1373 g H_2O.

0,1686 g Substanz: 15,4 ccm N (18°, 755 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ 54,75, „ 10,14, „ 10,42.

Spezifische Drehung des Leucins in wässeriger Lösung.

Angewandt: 0,2542 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 11,4793 g. Prozentgehalt 2,21. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: —0,46°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}42^\circ.$$

Spezifische Drehung des Leucins in salzsaurer Lösung.

Angewandt: 0,3793 g Substanz in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,3333 g. Prozentgehalt 3,66. Spez. Gewicht 1,1. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: + 1,25°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}53^\circ.$$

l-Leucin aus Casein.

Als Ausgangsmaterial diente ein nach dem Verfahren von Hammarsten dargestelltes Casein. l-Leucin von genau den-

[1]) Biochem. Zeitschr. **1**, 8, 1906.

selben Eigenschaften wurde daraus sowohl aus den direkt krystallisierenden Rohleucinen als auch auf dem Wege der Estermethode erhalten, wenn man sie wie eben angegeben entmischt.

I. 250 g dieses Proteins wurden mit ungefähr 2 l 33 proz. Schwefelsäure wie früher beschrieben hydrolysiert und die hydrolisierte Lösung ebenfalls in oben angegebener Weise auf Rohleucin verarbeitet. Es wurden so 27 g eines schwach bräunlich gefärbten Pulvers erhalten. Das rohe Leucin wurde in die Kupfersalze verwandelt, die Kupfersalze wieder mit Methylalkohol ausgelaugt, das zurückbleibende Kupfersalz von neuem in die freien Aminosäuren übergeführt, diese nochmals mit Methylalkohol behandelt und so in ähnlicher Weise wie beim Ovalbumin der Entmischungsprozeß sukzessive fünfmal durchgeführt.

Zum Unterschied von dem früheren Verfahren geschah die Zerlegung der in Methylalkohol unlöslichen Kupfersalze diesmal in der Weise, daß dieselben in einem größeren Kolben suspendiert und unter Durchleiten eines Dampfstromes bis zur vollständigen Überführung des Kupfers in Kupfersulfid portionsweise mit einer Lösung von Schwefelammon behandelt wurden. Das überschüssige Schwefelammon entfernte man unter Kochen mit Bleicarbonat, filtrierte sodann und trug darauf nach dem Wegdampfen des noch vorhandenen Ammoniaks zur erneuten Überführung in die Kupfersalze Kupfercarbonat in die Lösung ein. Während bei der ersten Entmischung 8 g methylalkohollösliches Kupfersalz zu extrahieren waren, ließen sich bei der fünften Auslaugung nur noch 0,7 g davon isolieren. Aus dem schließlich verbleibenden Leucinkupfer wurden 7,6 g Rohprodukt der Aminosäure gewonnen, das bei zweimaligem Umkrystallisieren 3,8 g reines l-Leucin lieferte. Schmelzpunkt bei schnellem Erhitzen im geschlossenen Rohr: 292°.

Zur Bestimmung der Löslichkeit wurde die Substanz 24 Stunden lang in einem Ostwaldschen Thermostaten bei 20° mit einer zur Lösung ungenügenden Menge Wasser geschüttelt. In 10,6245 g der filtrierten Lösung waren enthalten 0,2380 g Substanz. Demnach sind zur Lösung von 1 Teil Leucin 44,6 Teile Wasser von 20° nötig.

0,1758 g Substanz: 0,3532 g CO_2, 0,1533 g H_2O.

0,1797 g Substanz: 16,8 ccm N (17°, 749 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96 H 9,92 N 10,69.

Gef. „ 54,78 „ 9,67 „ 10,84.

Spezifische Drehung des l-Leucins aus Casein in wässeriger Lösung:

Angewandte Substanz: 0,2380 g. Gesamtgewicht der Lösung 10,6245 g. Prozentgehalt 2,24. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −0,46°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}35^\circ.$$

Spezifische Drehung des l-Leucins aus Casein in salzsaurer Lösung:

Angewandte Substanz: 0,6324 g. Gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 17,2618 g. Prozentgehalt 3,66. Spez. Gewicht 1,1. Drehung im 200 mm - Rohr bei 20° im Natriumlicht: +1,26°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}64^\circ.$$

II. Die Mutterlaugen der bei der Hydrolyse aus Casein durch direkte Krystallisation erhaltenen Rohleucine wurden scharf eingedampft und nach der Fischerschen Vorschrift mit Alkohol und Salzsäure verestert. Bei der Destillation der Ester unter 20 mm Druck wurde die Fraktion zwischen 40—110° aufgefangen und durch Kochen mit Wasser verseift. Die beim Eindampfen der wässerigen Lösung zurückbleibenden Krystalle wurden mit 70proz. Alkohol gewaschen. Auf diese Weise ließen sich aus dem Casein noch 8,5 g Aminosäuren gewinnen. Durch dreimaliges Entmischen der Kupfersalze mit Methylalkohol in der vorgeschriebenen Weise gelang es darauf, 1,4 g durch zweimalige Umkrystallisation gereinigtes l-Leucin abzuscheiden. Schmelzpunkt 292° im geschlossenen Rohr.

0,0905 g Substanz: 8,2 ccm N (16° 757 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. N 10,69.

Gef. „ 10,66.

Spezifische Drehung des Leucins in salzsaurer Lösung:

0,6324 g Substanz gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 17,2665 g. Prozentgehalt 3,66. Spez. Gewicht 1,1. Drehung im 200 mm - Rohr bei 20° im Natriumlicht: +1,27°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}77^\circ.$$

Insgesamt wurden also aus 250 g reinem Casein eine Ausbeute von 5,2 g reinem l-Leucin erhalten.

l-Leucin aus Hefe.

Ungefähr 3 kg frische obergärige Brennereihefe der Rasse XII, die aus dem Berliner Institut für Gärungsgewerbe bezogen war, wurde in Chloroformwasser einige Wochen der Selbstverdauung bei ungefähr 30° überlassen, bis eine klar filtrierte Probe der Lösung die Biuretreaktion nicht mehr gab. Das Filtrat der Hefezellen wurde zum Sirup eingedampft und nach der Fischerschen Methode verestert.[1])

Bei der Destillation der Ester wurden aus der zwischen 40 und 100° bei 18—20 mm Druck übergehenden Fraktion ein rohes Gemisch von Aminosäuren gewonnen, dessen Kupfersalze zu einem Teil dem oben mehrfach beschriebenen Entmischungsverfahren unterworfen wurden. Nach fünfmaliger Regenerierung und erneuter Auslaugung wurden ungefähr 2 g reines l-Leucin erhalten. Infolge größerer mechanischer Verluste ließ sich die Ausbeute in diesem Falle nicht genauer angeben. Das reine Präparat schmolz bei 293°.

0,1134 g Substanz: 0,2280 g CO_2, 0,1012 g H_2O.
0,1058 g Substanz: 9,6 ccm N (22°, 762 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96 H 9,92 N 10,69.
Gef. „ 54,76 „ 9,87 „ 10,53.

Spezifische Drehung des l-Leucins aus Hefe in wässeriger Lösung:

0,1150 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 5,1623 g. Prozentgehalt 2,22. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht −0,24°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}8^\circ.$$

Spezifische Drehung des l-Leucins aus Hefe in salzsaurer Lösung:

0,2388 g Substanz gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 8,6923 g. Prozentgehalt 3,64. Spez. Gewicht 1,1. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,62°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}46^\circ.$$

---

[1]) Die Einzelheiten des dabei angewandten Verfahrens werden im folgenden Teil der Arbeit noch näher beschrieben.

Verhalten des l-Leucins gegen kochende Schwefelsäure und Salzsäure.

Obwohl die drei Leucinpräparate aus verschiedenen Eiweißarten in wässeriger und salzsaurer Lösung übereinstimmende Drehungswerte zeigten, so ließ sich doch immerhin noch einwenden, daß vielleicht bei der Hydrolyse des betreffenden Proteins oder bei der Behandlung der hydrolysierten Lösungen mittels Säuren eine partielle Racemisierung des ursprünglichen Leucins eingetreten war, die den niedrigeren Drehungswert dieser Präparate gegenüber den früher beobachteten erklärlich machen konnte. Daß durch Alkali eine solche Racemisierung des aktiven Leucins stattfindet, ist aus früheren Arbeiten zur Genüge bekannt, und man hat gerade die Erhitzung mit Barytwasser zur künstlichen Inaktivierung von optisch-aktiven Aminosäuren häufig angewandt.

Dagegen liegen bisher keine experimentellen Angaben darüber vor, ob aktives Leucin auch durch Erhitzen mit Säuren racemisiert werden kann.

Die folgenden Versuche zeigen, daß unter den Bedingungen der Eiweißhydrolyse mit Säuren jedenfalls eine Racemisierung des l-Leucins auch nicht teilweise erfolgt, so daß nunmehr nicht daran zu zweifeln ist, daß die nach dem obigen Verfahren aus Eiweiß isolierten Leucinpräparate ihren vollen ursprünglichen Drehungswert besitzen.

Für die Versuche wurde ein l-Leucin aus Casein benutzt von $[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}35^\circ$ in wässeriger Lösung und $[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}64^\circ$ in 20proz. Salzsäure, ferner ein d-Leucin, das aus synthetischem Leucin durch Spaltung mittels Hefe gewonnen war und ein spezifisches Drehungsvermögen von $[\alpha]_D^{20^\circ} = +10{,}34^\circ$ in wässeriger Lösung und von $[\alpha]_D^{20^\circ} = -15{,}4^\circ$ in 20%iger Salzsäure aufwies.

I. Erhitzen des l-Leucins mit Schwefelsäure.

Circa 2 g l-Leucin vom angegebenen Drehungsvermögen wurden in 150 ccm 33proz. Schwefelsäure gelöst und die Lösung rückfließend 24 Stunden gekocht. Aus der wasserklaren Flüssigkeit wurde mit etwas weniger als der berechneten Menge gesättigter Barytlösung die Hauptmenge der Schwefelsäure ausgefällt und das Filtrat vorsichtig mit verdünnter Barytlösung bis zur Entfernung

der Schwefelsäure versetzt. Die durch Eindampfen der wässerigen Lösung wiedergewonnene Aminosäure wurde nach dem Umkrystallisieren auf ihre Drehung untersucht:

Ein Teil der Substanz braucht bei 20° 44,4 Teile Wasser zur Lösung. Schmelzpunkt 293° in geschlossener Capillare.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,1872 g Substanz wurden gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 8,3105 g. Prozentgehalt 2,25. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −0,48°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}66^\circ.$$

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,6091 g Substanz wurden gelöst in 20 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 16,6488 g. Spez. Gewicht 1,1. Prozentgehalt 3,65. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +1,24°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}44^\circ.$$

II. Erhitzen des l-Leucins mit Salzsäure.

Eine Lösung von 1,5 g reinem l-Leucin in 100 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 wurde am Rückflußkühler 24 Stunden gekocht. Zur Vertreibung der überschüssigen Salzsäure wurde dann mehrmals unter Zusatz von Wasser auf dem Wasserbade eingedampft, durch Kochen mit Bleioxyd das Chlor vollständig entfernt und das überschüssige Blei aus der Lösung mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Die so erhaltene wässerige Lösung der Aminosäure wurde eingedampft und der Rückstand umkrystallisiert. Das regenerierte Leucin zeigte in Salzsäure folgenden Drehungswert:

0,3785 g Substanz wurden gelöst in 20 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,3370 g. Prozentgehalt 3,66. Spez. Gewicht 1,1. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +1,26°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +15{,}64^\circ.$$

III. Erhitzen des d-Leucins mit Salzsäure.

3 g d-Leucin wurden rückfließend 20 Stunden mit einem halben Liter rauchender Salzsäure gekocht. Die salzsaure Lösung

wurde dann wiederholt unter Aufnahme mit Wasser zur Vertreibung der Salzsäure abgedampft, der Rest des Chlors unter Kochen mit Bleioxyd ausgefällt und aus dem Filtrat das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt. Die filtrierte Lösung wurde zur Trockne verdampft und der Rückstand zweimal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert.

Das wiedergewonnene d-Leucin zeigte in wässeriger und salzsaurer Lösung folgende Drehungswerte:

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,3121 g Substanz wurden gelöst in Wasser. Gewicht der Lösung 14,0546 g. Prozentgehalt 2,22. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,47°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +10{,}59^\circ.$$

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,6326 g Substanz wurden gelöst in 20 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 17,2782 g. Prozentgehalt 3,66. Spez. Gewicht 1,1. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −1,24°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -15{,}40^\circ.$$

Die Substanz zeigte bei 20° eine Löslichkeit von 1 : 45.

Die folgende Tabelle ermöglicht einen Überblick über die Werte der physikalischen Konstanten der aus Ovalbumin, Casein und Hefe erhaltenen Präparate von l-Leucin im Vergleich mit denen, die bisher aus synthetischem Leucin gewonnen sind (siehe nebenstehende Tabelle):

Zur Kenntnis des Isoleucins.

Isoleucin aus Melasseschlempe.

Aus den früheren Arbeiten über Isoleucin[1]) ergibt sich, daß als günstigstes Ausgangsmaterial für die Darstellung dieser Aminosäure die Strontianentzuckerungslaugen zu betrachten sind. Diese letzten Abfälle der Zuckerfabrikation werden erhalten, wenn man die Melasse mit Strontianhydrat entzuckert und die vom Bistrontiumsaccharat abfiltrierten Laugen nach Ausfällen des über-

[1]) F. Ehrlich, Zeitschr. d. Vereins d. Deutsch. Zuckerind. **54**, Heft 581, 775; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1809, 1904 u. **40**, 2538, 1907.

schüssigen Strontiums mittels Kohlensäure zum Sirup eindampft. Aus diesen sogenannten Melasseschlempen, die man heute im

Physikalische Konstanten der bisher erhaltenen reinsten Präparate von optisch-aktivem Leucin.

	Herkunft	Darstellungsweise	Spezifische Drehung in Wasser $[\alpha]_D^{20°}$	Spezifische Drehung in 20proz. Salzsäure $[\alpha]_D^{20°}$	Löslichkeit in Wasser bei 20°	Autoren
l-Leucin	Aus synth. Leucin	Über d. Cinchoninsalz d. Benzoylverbindung	—	+15,6° bis +16°	—	E. Fischer[1])
l-Leucin	do.	Über d. Brucinsalz d. Formyl-Leucin	—	+15,6°	—	E. Fischer u. Warburg[2])
d-Leucin	do.	Durch Verfütterung an ein Kaninchen	—	−15,5°	—	desgl.
d-Leucin	do.	Durch Spaltung mittels Hefe und Zucker	+10,34°	-15,40°	1 : 48	F. Ehrlich[3])
l-Leucin	Aus Ovalbumin	Bei d. Hydrolyse m. H_2SO_4 aus direkt kryst. Rohleucinen	−10,42°	+15,53°	1 : 45	Vgl. diese Arbeit
l-Leucin	AusCasein	do.	−10,35°	+15,64°	1 : 45	do.
l-Leucin	do.	Aus d. Rohleucinen d. Estermeth.	—	+15,77°	—	do.
l-Leucin	Aus Hefe	Durch Selbstverdauung. Aus den Rohleucinen d. Estermethode	−10,8°	+15,46°	—	do.
l-Leucin	AusCasein	Dasselbe Präparat wie oben n. 24stünd. Erhitzen m. 33proz. H_2SO_4	−10,66°	+15,44°	1 : 44	do.
l-Leucin	do.	Dasselbe Präparat wie oben 24 Stunden m. konz. Salzsäure gekocht	—	+15,64°	—	do.
d-Leucin	Aus synth. Leucin	Dasselbe Präparat (F. Ehrlich) wie oben 20 Stunden mit konz. Salzsäure gekocht	+10,59°	−15,4°	1 : 45	do.

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2377, 1900.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 4004, 1905.
[3]) Biochem. Zeitschr. **1**, 25, 1906.

großen Maßstabe zur Gewinnung von Pottasche, Cyankali und Ammoniumsulfat verwendet, setzt sich nach kürzerer oder längerer Zeit der Aufbewahrung ein Krystallbrei anorganischer und organischer Substanzen ab. Diese Niederschläge lassen sich, wie früher gezeigt ist, in sehr einfacher Weise auf ein Rohleucin verarbeiten, das von allen bisher untersuchten den höchsten Gehalt an Isoleucin besitzt und aus dem diese interessante Substanz sehr leicht frei von anderen Aminosäuren — besonders vom Valin — völlig rein zu gewinnen ist.

Bisher ist das Isoleucin hauptsächlich aus Melasseschlempen der Zuckerraffinerie „Dessau" erhalten worden, die stark eingedampft zumeist ein sehr intensives Krystallisationsvermögen besaßen, und in vereinzelten Fällen aus Abfalllaugen der Fabrik „Groß-Mochbern", die erst sehr stark konzentriert, nach längerem Stehen Krystalle bildeten. Die durchschnittliche Ausbeute an Rohleucin betrug meist 1—2% der Trockensubstanz der Strontianentzuckerungslaugen.

Es wurden nun weiterhin Melasseschlempen verschiedener Herkunft auf ihre Krystallisationsfähigkeit und ihren Gehalt an Isoleucin geprüft. Dabei haben sich sehr wesentliche Unterschiede in den Ausbeuteverhältnissen der Rohleucine ergeben, was sich leicht dadurch erklärt, daß der Stickstoffgehalt der Rübe in den verschiedenen Jahren ein sehr wechselnder ist, und daß auch der Gehalt an anderen Stoffen, welche die Leucine am Auskrystallisieren verhindern, beträchtlich schwanken kann. Hierzu kommt noch der Umstand, daß die Entzuckerungsanstalten heute ihre Abfalllaugen auf eine viel geringere Konzentration wie früher eindampfen, so daß man meist genötigt ist, im Laboratorium die dünnen Sirupe weiter einzuengen und die Rückstände sehr lange Zeit in kühlen Räumen aufzubewahren, ehe sich genügende Mengen Krystalle abgesetzt haben. Es wurde daher neuerdings in vielen Fällen eine geringere Ausbeute an Rohleucin erhalten als früher, wo sehr große Mengen in der Fabrik bereits sehr stark konzentrierter und lange Zeit aufbewahrter Melasseschlempe zur Verfügung gestanden hatten, aus der die Leucine fast vollkommen auskrystallisiert waren.

So ließen sich beispielsweise bei sofortiger Verarbeitung von Melasseschlempe, die frisch aus Dessau bezogen war, für einzelne Portionen folgende Ausbeuten an Rohleucinen feststellen:

	Aus Melasseschlempe (konzentriert) g	Scharf abgesaugte Krystallmasse g	Daraus Rohleucine g
I.	14150	ca. 1350	16
II.	15880	„ 930	23
III.	6710	„ 1150	14,5
IV.	13100	„ 1150	21

Auch nach $2^1/_2$ monatlichem Aufbewahren stieg die Ausbeute an Rohleucinen nicht erheblich. Es ließen sich dann z. B. aus 7980 g Melasseschlempe (konzentriert) 2130 g Krystallbrei absaugen und daraus 15,1 g Rohleucine isolieren.

Größere Mengen Melasseschlempe wurden dann noch aus den Entzuckerungsanstalten „Rositz" und „Groß-Mochbern" bezogen. Die verhältnismäßig dünnen braunschwarzen Laugen zeigten gegenüber den Dessauer Melasseschlempen den bedeutend geringeren Trockensubstanzgehalt von 65,7° Brix. und hatten nur geringe Mengen Niederschläge abgesetzt, die lediglich aus anorganischen Salzen bestanden. Größere Quantitäten derselben wurden in einem großen Vakuumapparat auf ungefähr 80° Brix. eingedampft und der erhaltene Sirup längere Zeit kühl aufbewahrt. Die nach mehrmonatlichem Stehen abgesaugten Niederschläge lieferten nur wenig Leucin.

Um zu ermitteln, ob das Isoleucin aus Melasseschlempen der verschiedensten Herkunft irgendwelche Unterschiede in seinen Eigenschaften zeigt, wurde nach dem früher angegebenen Verfahren aus einem Gemisch des Rohproduktes der Melasserückstände aus Dessau, Groß-Mochbern und Rositz eine größere Probe Isoleucin hergestellt und eingehend untersucht. Es erwies sich in jeder Beziehung identisch mit dem früher[1]) beschriebenen.

Zur Untersuchung kam die zweimal aus verdünntem Alkohol umkrystallisierte Substanz, die im geschlossenen Rohr bei 280° schmolz.

0,1446 g Substanz: 13,6 ccm N (18°, 755 mm).
$C_6H_{13}NO_2$. Ber. N 10,69.
Gef. „ 10,96.

[1]) F. Ehrlich l. c.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,5023 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 13,7803 g. Prozentgehalt 3,65. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,70°

$[\alpha]_D^{20°} = +9{,}58°$ (F. Ehrlich $[\alpha]_D^{20°} = +9{,}74°$).

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,4989 g Substanz gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,9813 g. Spez. Gewicht 1,094. Prozentgehalt 4,54. Drehung im 200 mm - Rohr bei 20° im Natriumlicht: +3,65°

$[\alpha]_D^{20°} = +36{,}74°$ (F. Ehrlich $[\alpha]_D^{20°} = +36{,}80°$).

Analyse des Kupfersalzes:

Zur Analyse wurde die Substanz zweimal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und bei 110° getrocknet.

0,2503 g Substanz: 0,0612 g CuO.

$C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$. Ber. Cu. 19,65.
Gef. „ 19,54.

Das Nickelsalz des Isoleucins.

Von den Salzen des Isoleucins ist bisher das Kupfersalz und seine merkwürdigen Löslichkeitsverhältnisse besonders in Methyl- Äthyl- und Benzylalkohol eingehend beschrieben worden. Ein Teil der aus den verschiedenen Melasseschlempen dargestellten Aminosäure wurde im folgenden zur Bereitung des bisher unbekannten Isoleucinnickels benutzt, das in seinen Löslichkeitsverhältnissen dem Isoleucinkupfer sehr ähnlich ist.

Die wässerige Lösung des Isoleucins wurde mit überschüssigem Nickelcarbonat gekocht, filtriert und die Lösung auf dem Wasserbade eingedampft, wobei das Isoleucinnickel in krystallinisch bläulich-grünen Blättchen sich abschied. Das Nickelsalz wurde abgesaugt, kurz mit kaltem Wasser gewaschen und aus Wasser zweimal umkrystallisiert. Zur Analyse gelangte das bei 110° getrocknete Salz:

0,1214 g Substanz: 0,0226 g Ni.

$(C_6H_{12}NO_2)_2Ni$. Ber. Ni 18,42.
Gef. „ 18,59.

Das Isoleucinnickel ist ebenso wie das Kupfersalz wom Wasser schwer benetzbar, löst sich aber darin bedeutend schwerer wie dieses; in seiner Löslichkeit im Methyl-, Äthyl- und Benzylalkohol zeigte sich kein großer Unterschied gegenüber dem Isoleucinkupfer.

Das Kobaltsalz des Isoleucins

läßt sich auf ähnliche Weise durch Behandlung der wässerigen Lösung des Isoleucins mit Kobaltcarbonat herstellen. Seine Reindarstellung ist indes nicht vollständig gelungen, da das Salz nur undeutlich in rötlich gefärbten Blättchen krystallisiert. Es wurden daher nur seine Löslichkeitsverhältnisse untersucht; es löst sich schwer in Wasser, leichter in den verschiedenen Alkoholen.

Zur Trennung vom Leucin erweisen sich nach diesen Untersuchungen das Nickel- und Kobalt-Isoleucin weniger geeignet als sein Kupfersalz, so daß man hierfür wie bisher letztere Verbindung bevorzugen wird.

Versuche zur Gewinnung von Isoleucin aus verschiedenen Eiweißstoffen.

Für die Reingewinnung größerer Mengen Isoleucin kamen bisher einzig und allein die Strontianmelasseschlempen als Rohmaterial in Betracht. Es entstand nun die Frage, ob nicht irgend ein natürlicher Eiweistoff hierfür ebenso günstig zu verwenden war. Daß Isoleucin im Eiweiß in nicht geringen Mengen vorhanden und daraus durch Säure- oder enzymatische Hydrolyse zu gewinnen ist, ist bereits früher[1]) gezeigt, wobei auch für das Blutfibrin die genaue Darstellungsweise im einzelnen angegeben wurde. In den letzten Arbeiten[2]) war auch schon angedeutet worden, daß man nach dem Verfahren über das methylalkohollösliche Kupfersalz aus Eiweiß in den seltensten Fällen diese Verbindung rein, sondern meist nur im Gemisch mit der von E. Fischer Valin benannten Aminovaleriansäure erhalten kann.

In Fortsetzung dieser Arbeiten ließ sich nun bei Hydrolysen, die an Eiweißstoffen verschiedenster Art ausgeführt wurden, ebenfalls beobachten, daß man hierbei mit dem früher angegebenen Isolierungsverfahren immer nur Gemische von Isoleucin und

[1]) F. Ehrlich l. c.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2538, 1907.

Valin gewinnen kann. In Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden zeigte sich auch fernerhin, daß aus verschiedenartigen Proteinen stets bedeutend geringere Mengen Isoleucin gegenüber dem Leucin zu erhalten waren.

Bevor auf die Durchführung der Trennung von Isoleucin und Valin näher eingegangen wird, sei zunächst die Hydrolyse der einzelnen Eiweißstoffe, die in jedem Falle zur Auffindung eines Gemisches von Isoleucin und Valin führte, eingehender beschrieben.

Bei diesen Versuchen wurden gewöhnlich 250 g des betreffenden Proteins nach der Vorschrift von Kutscher und Kossel[1]), wie schon früher angegeben, mit ungefähr 2 l 33 proz. Schwefelsäure am Rückflußkühler ungefähr 20 Stunden gekocht, dann wurde die hydrolysierte Lösung nach Entfernung der Schwefelsäure bis zur Krystallisation des Tyrosins eingedampft, dieses abgeschieden und das Filtrat bis zur möglichst vollständigen Krystallisation des Gemisches der Leucine zum Sirup eingedampft. Das längere Zeit aufbewahrte Krystallgemisch wurde dann durch scharfes Absaugen nach Möglichkeit von der Mutterlauge befreit, mit 70 proz. Alkohol ev. unter Zusatz von etwas wässerigem Ammoniak bis zur gründlichen Auslaugung der anhaftenden sirupösen Bestandteile gewaschen. Das so erhaltene, schwach gelblich bis braun gefärbte Rohprodukt wurde direkt ohne Umkrystallisation in die Kupfersalze verwandelt und diese in bekannter Weise durch Extraktion mit Methylalkohol auf Isoleucinkupfer verarbeitet.

Aus den gesammelten Auszügen des Isoleucin- und Valinkupfers wurde dann der Methylalkohol abdestilliert, das zurückbleibende Kupfersalz meist ohne weitere Reinigung in wässeriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Schwefelkupfer eingedampft und der Rückstand durch mehrmalige Krystallisation gereinigt. Die so erhaltenen Aminosäuren wurden analysiert und auf die Drehung in wässeriger und salzsaurer Lösung untersucht.

Casein. Zur Hydrolyse wurden zwei Caseinpräparate verwandt:

1. „Lactarin“ mit 13,06% Stickstoffgehalt, ein von Bolle-Berlin durch Selbstsäurung der Milch hergestelltes Casein.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 168.

2. „Casein“ mit 12,7% Stickstoffgehalt, ein von derselben Firma durch Fällung mit Säuren gewonnener Eiweißstoff der Milch.

1. Aus 250 g Lactarin (Bolle) wurden 36,6 g nur schwach gelblich gefärbtes Rohprodukt erhalten. Nach der Überführung in die Kupfersalze lieferte dieses bei zweimaliger Extraktion mit Methylalkohol 8,6 g lösliches Kupfersalz, von dem ein Teil zweimal umkrystallisiert bei der Analyse auf ein Gemisch von Isoleucin- und Valin-Kupfer stimmende Werte ergab:

0,2866 g Substanz (bei 110° getrocknet): 0,0729 g CuO.

Für Isoleucin-Kupfer: $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 19,65.
Gef. „ **20,32.**

Für Valin-Kupfer: $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$. Ber. „ 21,51.

Die aus dem Kupfersalz abgeschiedene freie Aminosäure ergab zweimal umkrystallisiert bei der Analyse und der Bestimmung der optischen Drehung ebenfalls Werte, die zwischen den für Isoleucin und Valin berechneten liegen.

0,1211 g Substanz: 0,2301 g CO_2, 0,0980 g H_2O.

0,1135 g Substanz: 11,3 ccm N (23,5°, 761 mm).

Für Isoleucin: $C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69
Gef. „ **51,77**, „ **9,09**, „ **11,44**

Für Valin: $C_5H_{11}NO_2$ Ber. „ 51,28, „ 9,40, „ 11,97

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,6179 g Substanz, gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 11,4401. Prozentgehalt 5,4. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,73°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +6{,}7^\circ.$$

Für Isoleucin $[\alpha]_D^{20^\circ} = +9{,}74^\circ$[1]) für Valin $[\alpha]_D^{20^\circ} = +6{,}42^\circ$[2]).

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,7231 g Substanz wurden gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 15,8241 g. Spezifisches Gewicht 1,094. Prozentgehalt 4,57. Drehung im 200 mm - Rohr bei 20° im Natriumlicht: +3,23°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +32{,}30^\circ.$$

Für Isoleucin $[\alpha]_D^{20^\circ} = +36{,}80^\circ$[1]), für Valin $[\alpha]_D^{20^\circ} = +28{,}8^\circ$[2]).

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1809, 1904.
[2]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2320, 1906.

2. Aus 250 g Casein (Bolle) wurden 30,7 g gelblich gefärbtes Rohprodukt erhalten. Ausbeute an methylalkohollöslichem Kupfersalz nach dreimaliger Extraktion 9 g. Zur Analyse wurde wieder ein Teil zweimal aus Äthylalkohol umkrystallisiert:

Analyse des Kupfersalzes:

0,3069 g Substanz (bei 110° getrocknet): 0,0792 g CuO.
Für Isoleucin-Kupfer: $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 19,65.
Gef. „ **20,62.**
Für Valin-Kupfer: $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$. Ber. „ 21,51.

Reinausbeute an freier Aminosäure 2 g nach zweimaliger Umkrystallisation aus verdünntem Alkohol (bei 110° getrocknet).

0,1238 g Substanz: 0,2387 g CO_2, 0,1053 g H_2O.
0,1251 g Substanz: 12,3 ccm N (16°, 742 mm).
Für Isoleucin: $C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ **52,58**, „ **9,45**, „ **11,35.**
Für Valin: $C_5H_{11}NO_2$. Ber. „ 51,28, „ 9,40, „ 11,97.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,5178 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 13,7072 g. Prozentgehalt 3,78. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,54°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +7{,}14^\circ.$$

Für Isoleucin: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +9{,}74^\circ$, für Valin: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +6{,}42^\circ$.

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,6891 g Substanz wurden gelöst in 20 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 15,6181 g. Spez. Gewicht 1,094. Prozentgehalt 4,41. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +2,99°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +30{,}98^\circ.$$

Für Isoleucin: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +36{,}80^\circ$, für Valin: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +28{,}8^\circ$.

Aus den Analysen und den Werten für die Drehung geht hervor, daß in diesem Falle ein Gemisch aus ungefähr $^3/_4$ Valin und $^1/_4$ Isoleucin vorlag.

Ovalbumin. Aus dem Rohprodukt der Leucine aus 250 g Ovalbumin (Kahlbaum - Berlin) wurden über das methylalkohollösliche Kupfersalz ungefähr 3 g reiner Aminosäure erhalten.

0,1370 g Substanz: 0,2701 g CO_2, 0,1137 g H_2O;
0,1538 g Substanz: 15,0 ccm N (17°, 745 mm).

Für Isoleucin: $C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ **53,76**, „ **9,20**, „ **11,35**.

Für Valin: $C_5H_{11}NO_2$. Ber. „ 51,28, „ 9,40, „ 11,97.

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,4958 g Substanz wurden gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,7946 g. Spez. Gewicht 1,094. Prozentgehalt 4,59. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +3,16°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +31{,}46^\circ.$$

Für Isoleucin: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +36{,}80^\circ$, für Valin: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +28{,}8^\circ$.

Ähnliche, durch Krystallisation nicht weiter zerlegbare Gemische von Isoleucin und Valin haben neuerdings Adensamer und Hoernes[1]) aus demselben Eiweißstoff nach einem anderen Verfahren gewinnen können.

Schwamm. Aus ungefähr 200 g hydrolysiertem rohem Schwamm wurde in der üblichen Weise das Rohprodukt der Leucine hergestellt, das ungefähr 3 g methylalkohollösliches Kupfersalz lieferte. Die daraus abgeschiedene, durch zweimaliges Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol gereinigte Aminosäure ergab bei 110° getrocknet folgende Analysenzahlen und Drehungswerte:

0,1545 g Substanz: 0,2986 g CO_2 0,1328 g H_2O;
0,1512 g Substanz: 15,0 ccm N (19°, 760 mm).

Für Isoleucin: $C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ **52,68**, „ **9,51**, „ **11,60**.

Für Valin: $C_5H_{11}NO_2$. Ber. „ 51,28, „ 9,40, „ 11,97.

Drehung in wässeriger Lösung:

0,6007 g Substanz, gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 15,7426 g. Prozentgehalt 3,81. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,45°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +5{,}90^\circ.$$

---

[1]) Wien. Monatsh. f. Chem. 26, 1217.

Drehung in salzsaurer Lösung:

0,5670 g Substanz wurden gelöst in 20 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,8040 g. Prozentgehalt 5,24. Spez. Gewicht 1,094. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +3,44°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +30{,}0^\circ.$$

Horn. 250 g Hornspäne lieferten nach der Hydrolyse 14,3 g Leucin-Rohprodukt, aus dem 5,9 g methylalkohollösliches Kupfersalz zu gewinnen waren. Reinausbeute 2 g durch zweimaliges Umkrystallisieren gereinigter Aminosäure.

0,1652 g Substanz: 0,3212 g CO_2, 0,1387 g H_2O;
0,0977 g Substanz: 9,75 ccm N (17°, 744 mm).

Für Isoleucin: $C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ **53,08**, „ **9,32**, „ **11,50**.

Für Valin: $C_5H_{11}NO_2$. Ber. „ 51,28, „ 9,40, „ 11,97.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,6909 g Substanz, gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 12,9850 g. Prozentgehalt 5,32. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +0,74°

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +6{,}94^\circ.$$

Versuche zur Trennung von Isoleucin und Valin.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchungen zeigen deutlich, daß man auf dem gewöhnlichen Wege über die methylalkohollöslichen Kupfersalze eine Abtrennung von Isoleucin und Valin nicht erzielen kann, und daß man daher aus natürlichen Eiweißstoffen fast stets ein Gemisch beider Aminosäuren erhält, in dem gewöhnlich Valin überwiegt.

Es wurde nun auf den verschiedensten Wegen aus diesen Gemischen eine Reindarstellung insbesondere des Isoleucins versucht; trotz Anwendung mehrfach variierter Methoden gelang es indes nicht, aus anderen Proteinen außer Melasseschlempe dasselbe in seiner ursprünglichen Form zu gewinnen.

Die schwere Trennbarkeit der beiden Aminosäuren beruht im wesentlichen auf ihrer großen Neigung selbst, sowohl wie in ihren Salzen und Derivaten miteinander Mischkrystalle zu bilden, die ähnlich wie beim Gemisch dieser Aminosäuren mit Leucin vollständig den Eindruck von chemischen Verbindungen machen.

Es war daher trotz vielfacher Versuche nicht möglich, Isoleucin und Valin durch Umkrystallisation der freien Aminosäure oder ihrer Salze zu entmischen; stets wurden dabei Produkte erhalten, die nach ihrer Drehung, Löslichkeit und ihren anderen physikalischen Eigenschaften aus Isoleucin und Valin in denselben Mengenverhältnissen zusammengesetzt waren, in denen die beiden Verbindungen zuerst auskrystallisierten.

Die Schwierigkeit der Trennung des Valins vom Isoleucin wird noch dadurch sehr bedeutend erhöht, daß sich eine ganz auffallende Übereinstimmung in den Löslichkeitsverhältnissen der Salze der beiden Aminosäuren zeigt, die eine Entmischung ähnlich etwa wie beim Leucin vollständig unmöglich macht. So beträgt z. B. in Methylalkohol die Löslichkeit des d-Isoleucin-Kupfers 1 : 55[1]) bei 17°, ist also fast genau die gleiche wie die vom d-Valin-Kupfer, das sich bei 18° im Verhältnis von 1 : 52 löst[2]).

Bei der Aussichtslosigkeit, eine Entmischung der fast gleich löslichen Salze und Derivate des Isoleucins und Valins herbeizuführen, wurden dann weiterhin Versuche angestellt, eine solche nach Umwandlung der Aminosäuren selbst vorzunehmen. Ein häufig benutzter Umwandlungsprozeß, bei dem die Aminosäuren, ihre Salze und Derivate, sehr wesentliche Veränderungen in ihren Löslichkeitsverhältnissen erleiden, ist die Racemisierung, die bekanntlich nach der Methode von E. Schulze zumeist in der Weise ausgeführt wird, daß man die Aminosäuren mit überschüssigem Barytwasser im Autoklaven auf Temperaturen bis 180° genügend lange erhitzt. Die so hergestellten racemischen Aminosäuren zeigen sich meist bedeutend schwerer löslich als die aktiven; so ist z. B. das racemische Leucin noch einmal so schwer löslich in Wasser wie das aktive. Es sind daher auch die Racemkörper, besonders von E. Fischer, zur leichteren Isolierung natürlich vorkommender Aminosäuren häufig benutzt worden.

Durch längere Behandlung mit Barytwasser wurde nun zuerst versucht, Unterschiede in der Löslichkeit des Isoleucins und Valins hervorzurufen, in der Hoffnung, vielleicht so eine teilweise Trennung der beiden Aminosäuren herbeiführen zu können.

---

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1826, 1904.

[2]) E. Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 38, 1905.

Kocht man ein solches Gemisch von Isoleucin und Valin längere Zeit im Autoklaven unter ca. 10—14 Atmosphären Druck mit Barytwasser, so wird das aktive d-Valin vollständig racemisiert, während das d-Isoleucin ungefähr zur Hälfte sich in d-Allo-Isoleucin verwandelt, d. h. in eine stereoisomere Verbindung, die nicht den optischen Antipoden des ursprünglichen d-Isoleucins darstellt.[1]) Auch aus dem so erhaltenen Gemisch von d-l-Valin, d-Isoleucin und d-Allo-Isoleucin ließ sich durch fraktionierte Krystallisation sowohl der freien Aminosäuren wie ihrer Salze keine einheitliche Substanz isolieren. Dagegen fanden sich in den Löslichkeitsverhältnissen der Kupfersalze der beiden Isoleucine gegenüber dem des racemischen Valins sehr bedeutende Unterschiede. Während nämlich die Löslichkeit des Allo-Isoleucin-Kupfers in wässeriger und alkoholischer Lösung fast die gleiche ist wie die des Isoleucin-Kupfers, wird das Kupfersalz des r-Valins im Gegensatz zu den Kupfersalzen der beiden Isoleucine und dem des aktiven Valins von Methylalkohol nur wenig aufgenommen und ist in Äthylalkohol praktisch unlöslich.

Die Löslichkeitsverhältnisse des racemischen Valinkupfers wurden in der Weise näher untersucht, daß man in der betreffenden Flüssigkeit einen Überschuß des Salzes längere Zeit kochte, dann auf eine bestimmte Temperatur abkühlte und abfiltrierte. Hierbei ergaben sich für die Löslichkeit in Methylalkohol und 96proz. Äthylalkohol folgende Zahlen:

Löslichkeit des rac.-Valin-Kupfers in konzentriertem Methylalkohol:

bei 20° . . . . . 1 : 3644,
bei 23° . . . . . 1 : 3048.

Löslichkeit des rac.-Valin-Kupfers in 96proz. Äthylalkohol:

bei 21° . . . . . 1 : 9230.

Löslichkeit des d-Isoleucin-Kupfers:[2])

in konz. Methylalkohol bei 17° . . . . 1 : 55,

Löslichkeit des d-Isoleucin-Kupfers:[2])

in 99proz. Äthylalkohol bei 18° . . . 1 : 476.

---

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2538, 1907.
[2]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1826, 1904.

Löslichkeit des d-Allo-Isoleucinkupfers ungefähr die gleiche[1]).

Löslichkeit des d-Valin-Kupfers[2]):

in konz. Methylalkohol bei 18° . . . . 1 : 52.

Auf diese beträchtlichen Unterschiede der Löslichkeit der Kupfersalze ließ sich nun eine Methode der ungefähren Trennung von Isoleucin und Valin begründen, deren Ausführung kurz die folgende war:

Das über die methylalkohollöslichen Kupfersalze aus irgend einem Eiweißkörper erhaltene Gemisch von d-Isoleucin und d-Valin wurde mit Barytwasser im Autoklaven bei 180° racemisiert, die nach Entfernung des Baryts wiedergewonnenen Aminosäuren in die Kupfersalze verwandelt und die Mischung der Kupfersalze mit Methylalkohol in der Kälte geschüttelt oder mit 96proz. Äthylalkohol ausgekocht, wobei die Kupfersalze der beiden Isoleucine in Lösung gingen, und wenn dieser Prozeß lange genug fortgesetzt wurde, das Kupfersalz des racemischen Valin fast rein zurückblieb.

Günstiger hat es sich erwiesen, für die Trennung der Kupfersalze nur Äthylalkohol anzuwenden, da zwar beim ersten kräftigen Ausschütteln mit Methylalkohol, wie z. B. beim Casein gezeigt werden konnte, nur Isoleucin-Kupfer in Lösung geht, später aber auch im Gemisch damit Valin-Kupfer, und da andererseits das zurückbleibende Salz immer noch, wie aus den Analysen hervorging, Isoleucin-Kupfer zurückhält.

Es gelang so in Kombination mit dem früher beschriebenen Verfahren die Leucinfraktion aus Casein und Hefeeiweiß fast vollständig in ihre reinen Komponenten zu zerlegen, nämlich in l-Leucin, dl-Valin und in das bekannte Gemisch von d-Isoleucin und d-Allo-Isoleucin, die sich sämtlich in analysenreiner Form erhalten ließen.

Zur näheren Identifizierung des Valins und Isoleucins wurde dann noch eine Spaltung der umgelagerten Aminosäuren mittels Hefegärung vorgenommen, die in beiden Fällen zur Gewinnung von fast reinem l-Valin und d-Allo-Isoleucin führte.

---

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2555, 1907.

[2]) E. Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 38, 1905.

Ein am Casein (Bolle) durchgeführter Vorversuch möge zunächst die Löslichkeitsverhältnisse des Gemisches der Kupfersalze der schon mehrfach erwähnten Aminosäuren veranschaulichen:

4,2 g eines nach dem früher beschriebenen Verfahren aus Casein (Bolle) dargestellten Gemisches der Kupfersalze von d - Isoleucin und d -Valin mit einem Gehalt von 20,62% Kupfer Cu (s. S. 38) wurden in Wasser gelöst und zur Entfernung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff behandelt. Die aus dem Filtrat durch Eindampfen wiedergewonnenen Aminosäuren (3,8 g) wurden in einer Lösung von 15 g Barythydrat in einem halben Liter Wasser aufgelöst und im Autoklaven 20 Stunden auf 180° erhitzt. Nach quantitativer Entfernung des Baryts mit verdünnter Schwefelsäure wurde die schwach linksdrehende[1]) Lösung mit überschüssigem Kupfercarbonat gekocht, filtriert, das klare, tiefblaue Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert (3,85 g).

Diese 3,85 g des so gewonnenen reinen Kupfersalzes wurden nacheinander mit je einem halben Liter konzentrierten Methylalkohols je zwei Stunden ausgekocht, wobei stets vor dem Abfitrieren auf Zimmertemperatur abgekühlt wurde. Das Auslaugen wurde so lange fortgesetzt, bis der Alkohol sich nur noch ganz schwach blau färbte.

Nach mehrmaligem Auskochen zeigte das rückständige umkrystallisierte Kupfersalz folgenden Kupfergehalt:

0,3138 g Substanz (bei 110° getrocknet) 0,0834 g CuO.
Für Valin-Kupfer: $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 21,51.
Gef. „ 21,24.

Beim letztmaligen Auskochen hinterblieb schließlich ein Salz — im ganzen ca. 0,8 g umkrystallisiert — folgender auf Valin-Kupfer stimmender Zusammensetzung:

0,2388 g Substanz (bei 110° getrocknet) 0,0641 g CuO.
Für Valin-Kupfer: $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 21,51.
Gef. „ 21,35.

---

[1]) Entsprechend der Drehungsrichtung des d-Allo-Isoleucins, das in wässeriger Lösung stärker nach links dreht ($[\alpha]_D = -14{,}4°$) als das d-Isoleucin nach rechts ($[\alpha]_D = +9{,}7°$).

Die gesammelten methylalkoholischen Auszüge wurden vom Alkohol befreit und lieferten beim Umkrystallisieren 2,1 g Kupfersalz, das auf die Zahlen des Isoleucin-Kupfers stimmende Analysenwerte ergab:

0,2891 g Substanz (bei 110° getrocknet) 0,0708 g CuO.
Für Isoleucin-Kupfer: $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 19,65.
Gef. „ 19,57.

l-Valin und d-Allo-Isoleucin aus Casein.

250 g reines Casein (nach Hammarsten) wurden mit ca. 2 l 33proz. Schwefelsäure in der früher angegebenen Weise hydrolysiert und auf Rohleucine verarbeitet, von denen 27 g in Form eines weißen Pulvers erhalten wurden.

Zur Entfernung etwa vorhandenen Prolins wurde das Aminosäuregemisch mit 1 l absoluten Alkohols am Rückflußkühler 3 Stunden gekocht, wobei 2 g Substanz in Lösung gingen.

Die zurückbleibenden 25 g wurden in die Kupfersalze verwandelt und diese durch Auslaugen mit Methylalkohol unter wiederholter Zersetzung wie angegeben entmischt. Die methylalkoholischen Auszüge wurden gesammelt und eingedampft. Eine Probe des Salzes aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, gab folgende auf ein Gemisch von Isoleucin- und Valin-Kupfer stimmende Analysenzahl:

0,3016 g Substanz (bei 110° getrocknet) 0,0792 g CuO.
Für Isoleucin-Kupfer $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 19,65.
Gef. „ **20,98.**
Für Valin-Kupfer $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$. Ber. „ 21,51.

Das Kupfersalz wurde dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Schwefelkupfer eingedampft und die zurückbleibende Aminosäure (7 g) wieder mit 30 g Barythydrat in ca. $^1/_2$ l Wasser im Autoklaven 20 Stunden auf 180° erhitzt. Die nach Ausfällen des Baryts wiedergewonnenen Aminosäuren wurden in die Kupfersalze verwandelt (ca. 6 g bei 110° getrocknet). Diese wurden fein pulverisiert, in einer Flasche auf der Schüttelmaschine mit ca. $^1/_2$ l Methylalkohol $1^1/_2$ Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der methylalkoholische Auszug gab beim Verdampfen 2,1 g Rückstand (Kupfersalz I in Methylalkohol löslich).

Das abfiltrierte Salz wurde dreimal je 2 Stunden mit den gleichen Mengen Methylalkohol wie oben geschüttelt. Der letzte Auszug färbte sich nur noch wenig blau. Die gesammelten methylalkohollöslichen Extrakte lieferten noch 2,4 g Kupfersalz (Kupfersalz II in Methylalkohol löslich).

Es blieben schließlich noch ungefähr 2 g Kupfersalz von Methylalkohol ungelöst zurück (Kupfersalz III in Methylalkohol unlöslich).

d - Allo - Isoleucin. I. Die wässerige Lösung des in Methylalkohol löslichen Kupfersalzes I wurde zur Ausfällung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff behandelt und aus dem Filtrat vom Schwefelkupfer die freie Aminosäure durch Eindampfen zurückgewonnen. Das so erhaltene Rohprodukt in einer Menge von 1,8 g wurde zusammen mit 100 g Zucker in $1^1/_2$ l Leitungswasser gelöst und die Lösung mit 50 g frischer obergäriger Brennereipreßhefe[1]) versetzt. Wie der negative Ausfall der Naphtholreaktion zeigte, war die Gärung nach 3 Tagen beendet. Es wurde sodann von der Hefe abfiltriert und das vollständig klare Filtrat erst auf freier Flamme, dann auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup eingedampft. Nach längerem Stehen wurden die ausgeschiedenen Krystalle scharf abgesaugt und auf Ton gepreßt. Die rohe Aminosäure wurde durch Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol gereinigt, wobei ca. 0,5 g weißer glänzender Blättchen vom Schmelzpunkt 280° im geschlossenen Rohr erhalten wurden, die annähernd die Drehung des d-Allo-Isoleucins zeigten.

0,0726 g Substanz: 6,8 ccm N (21°, 757 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. N 10,69.

Gef. „ 10,83.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung.

0,3757 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 10,4163 g. Prozentgehalt 3,61. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −0,90°.

$$[\alpha]_D^{20^0} = -12{,}87°.$$

---

[1]) Rasse XII bezogen vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin. Analyse:

Wasser	75,9%	
Trockensubstanz . .	24,1%	Stickstoff in der Trocken-
Asche	2,18%	substanz 8,01%.
Stickstoff	1,93%	

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,3596 g Substanz gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 7,6223 g. Prozentgehalt 4,71. Spez. Gewicht 1,094. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −5,15°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -34{,}38^\circ.$$

II. Aus der zweiten Portion des methylalkohollöslichen Kupfersalzes (Kupfersalz II) wurden 1,8 g Aminosäure gewonnen. Die Substanz zeigte in wässeriger Lösung schwache Linksdrehung: 0,2 g in 10 ccm Wasser gelöst, drehten im 200 mm-Rohr bei 20° im Soleil-Ventzke-Apparat −0,4° Sacch.

Die gesamte Menge des Rohproduktes wurde zusammen mit 100 g Raffinade in $1^1/_2$ l Wasser gelöst und die Lösung mit 50 g Hefe vergoren. Nach beendeter Vergärung wurde die hefefreie Gärungsflüssigkeit bis zur Krystallisation des schließlich erhaltenen Sirups verdampft. Die auskrystallisierte Aminosäure wurde durch Umkrystallisation aus verdünntem Alkohol gereinigt, Reinausbeute ca. 0,5 g.

0,1718 g Substanz: 16,4 ccm N (13°, 747 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. N 10,69.

Gef. „ 11,20.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,2189 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 10,6652 g. Prozentgehalt 2,05. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −0,41°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -10{,}0^\circ.$$

Die Analysenzahlen und die Drehungswerte zeigen, daß die erste Portion des methylalkoholischen Auszuges der Kupfersalze nach der Behandlung mit Barytwasser fast reines Isoleucin geliefert hat, während das Isoleucin aus dem zweiten Auszuge noch eine geringe Menge Valin enthält.

l-Valin. Aus dem nach der Behandlung mit Barytwasser erhaltenen methylalkoholunlöslichen Kupfersalz (Kupfersalz III) wurden nach der Zersetzung mit Schwefelwasserstoff ungefähr 2 g Aminosäure gewonnen. Diese Menge wurde in $1^1/_2$ l Wasser zusammen mit 100 g Zucker durch 50 g frischer Preßhefe vergoren und wie früher auf unvergorene Aminosäure verarbeitet. Reinausbeute ca. 0,3 g.

0,0851 g Substanz: 8,2 ccm N (17°, 743 mm).
$C_5H_{11}NO_2$ .Ber. N 11,95.
Gef. „ 11,09.

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,1745 g Substanz wurden gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 3,8343 g. Prozentgehalt 4,53. Spez. Gewicht 1,094. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: —1,55°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -31{,}2^\circ.$$

Nach Fischer[1]) $[\alpha]_D^{20^\circ} = -28{,}8^\circ.$

Auch hier ist die Entmischung keine ganz vollständige geworden, da die höhere Drehung in salzsaurer Lösung und der etwas niedrigere Stickstoffgehalt daraufhin deuten, daß das schließlich erhaltene Valin noch eine kleine Quantität Isoleucin einschließt.

l-Valin und d-Allo-Isoleucin aus Hefe.

Für die folgenden Versuche diente eine vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe ganz frisch bezogene rein gezüchtete obergärige Brennereipreßhefe der Rasse XII, die nach den Analysenwerten folgende Zusammensetzung hatte:

Wasser	73,00%
Asche	2,14%
Organ. Substanz	24,86%
	100,00%

Die Hefe enthielt 2,64% Stickstoff, also in der Trockensubstanz 8% Stickstoff.

9 kg dieser Hefe wurden in einer großen Flasche in 7 l Wasser suspendiert und das Ganze nach Zusatz von 200 ccm Chloroform gut durchgeschüttelt. Die mit einem Wattebausch verschlossene Flasche wurde bei ungefähr 30° C angesetzt. Nach dreiwöchentlichem Stehen gab eine abfiltrierte und mit Tonerde geklärte Probe keine Biuretreaktion mit Fehlingscher Lösung mehr. Darauf wurde die dunkelbraune Lösung von dem hellen Bodensatz zum größten Teil abgehebert, der übrige Teil abkoliert und

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2320, 1906.

die ungelöst gebliebenen Hefeteile mehrmals mit Wasser ausgewaschen. Aus den gesammelten trüben Filtraten senkten sich beim Aufkochen flockenartige Ausscheidungen, von denen abfiltriert wurde.

Die klare dunkelbraune Lösung schied beim Eindampfen über freier Flamme und später auf dem Wasserbade Tyrosinkrystalle ab, die abfiltriert und mit kaltem Wasser gut gewaschen wurden. Durch weiteres nochmaliges Eindampfen ließ sich noch ein Teil Tyrosin gewinnen. Darauf wurden die Filtrate auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup eingeengt.

Versuche, aus dem sich dabei ausscheidenden Krystallbrei Rohleucin in der früher gekennzeichneten Reinheit zu gewinnen, schlugen fehl[1]). Der resultierende mit Krystallen durchsetzte Sirup wurde deshalb nach der Fischerschen Estermethode weiter verarbeitet.

Zu diesem Zweck wurde derselbe mit 1 l konzentrierter Salzsäure übergossen, die Lösung auf dem Wasserbade eingedampft, und dieser Prozeß nach Zusatz von Salzsäure mehrmals wiederholt. Der mit Wasser aufgenommene Sirup wurde von ausgeschiedenen Verunreinigungen nach kurzem Aufkochen mit Tierkohle durch Filtration über gehärtetes Filtrierpapier befreit, und die rotbraun gefärbte Flüssigkeit unter vermindertem Druck anfangs bei 40°, zuletzt bei ca. 60° bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Der in der Menge von 337 g zurückbleibende Sirup erstarrte beim Abkühlen zu einer festen breiigen Masse. Diese wurde mit 3 l absolutem Alkohol übergossen und anfangs in der Kälte, zuletzt unter Erwärmen, nach der Fischerschen Vorschrift mit trockenem Salzsäuregas verestert. Nach dem Verdampfen des Alkohols und der Salzsäure im Vakuum und Zusatz von neuem Alkohol zum rückständigen Sirup wurde der Veresterungsprozeß noch zweimal wiederholt.

Die nach Fischer mit Natronlauge und Natriumcarbonat befreiten und durch wiederholtes Ausschütteln mit Äther gewonnenen Ester wurden nach Verdampfen des Äthers unter einem Druck von 18—20 mm destilliert und dabei folgende Fraktionen erhalten:

[1]) Ähnliche Erfahrungen hat auch bereits M. Schenk gemacht, dem es nicht gelang, reines Leucin und Isoleucin aus derselben Hefe zu isolieren. Wochenschr. f. Brauerei 22, Nr. 16, 221.

	Temperatur:	Druck:	Destillat:
I	zwischen 15—40°	(40—22 mm)	37,9 g (schwachgelb, klar).
II	„ 40—100°	(20—18 mm)	70,0 g (wasserhell, klar).
III	über 100°	Rückstand	ca. 100 g (dunkelbraun, dickflüssig).

Weiter verarbeitet wurde nur die zweite Fraktion, deren Hauptmenge zwischen 75—90° überging.

Die Verseifung der gesamten zweiten Fraktion in einer Ausbeute von 70 g wurde durch sechsstündiges Kochen am Rückflußkühler mit ca. der fünffachen Menge Wasser ausgeführt. Die wässerige Flüssigkeit wurde bis zur möglichst vollständigen Krystallisation eingedampft, die ausgeschiedenen blättrigen Krystalle abgesaugt, die Mutterlauge stark eingeengt, und der ausgeschiedene Rest der Aminosäuren durch Abpressen auf Ton von sirupösen Bestandteilen befreit.

Die so im ganzen gewonnenen 42 g des Rohproduktes der Aminosäuren wurden fein gepulvert und mit absolutem Alkohol zweimal ausgekocht. Die schließlich unlöslich verbleibenden 36 g der farblosen Krystallmasse wurden durch Kochen mit Kupfercarbonat in die Kupfersalze übergeführt. Die fein gepulverten Kupfersalze wurden wiederholt mit Methylalkohol extrahiert, das rückständige Salz in die freien Aminosäuren übergeführt, diese von neuem mit Kupfercarbonat in die Kupfersalze zurückverwandelt, wiederum mit Methylalkohol erschöpft und dieser Prozeß wie früher angegeben zur möglichst vollkommenen Entmischung vom Leucin einerseits und Isoleucin und Valin andererseits fünfmal fortgesetzt[1]). Das schließlich verbleibende, in Methylalkohol unlösliche Kupfersalz wurde in bereits angeführter Weise auf l-Leucin verarbeitet.

Die gesammelten methylalkoholischen Auszüge wurden zur Trockne verdampft, wobei 11,4 g eines hellblau gefärbten Kupfersalzes verblieben. Durch Zersetzen seiner wässerigen Lösung mit Schwefelwasserstoff und nach dem Abfiltrieren des Schwefelkupfers wurden beim Eindampfen des Filtrates 8,5 g rohe Aminosäure gewonnen.

Ein Teil derselben wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und auf seine Elementarzusammensetzung und

[1]) Hierbei sind mechanische Verluste eingetreten.

Drehung untersucht. Die Analysenwerte gaben auf ein Gemisch von Valin und Isoleucin stimmende Zahlen:

0,1600 g Substanz: 0,3073 g CO_2, 0,1359 g H_2O;
0,1552 g Substanz: 15,3 ccm N (18°, 755 mm).

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ **52,37**, „ **9,44**, „ **11,37.**
$C_5H_{11}NO_2$. Ber. „ 51,28, „ 9,40, „ **11,95.**

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,7448 g Substanz wurden in 20proz. Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 16,2959 g. Prozentgehalt 4,57. Spez. Gewicht 1,094. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +3,24°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +32{,}40^\circ.$$

Um bei dieser Gelegenheit zu untersuchen, ob durch wiederholte Fraktionierung eine Anreicherung irgendeiner Aminosäure in dem Gemisch zu erzielen ist, wurde die gesamte Menge des erhaltenen Rohproduktes dreimal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, wobei immer nur die sich zuerst ausscheidenden Krystalle für die weitere Reinigung verwendet wurden. Es zeigte sich, daß auch nach diesem Verfahren ein gleich zusammengesetztes Gemenge von Valin und Isoleucin erhalten wurde, das genau dieselbe Drehung wie das erstere aufwies.

Spezifische Drehung der dreimal umkrystallisierten Aminosäure in salzsaurer Lösung:

0,7448 g Substanz wurden gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 16,3024 g. Prozentgehalt 4,57. Spez. Gewicht 1,094. Drehung der Lösung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: +3,24°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +32{,}40^\circ.$$

Die aus den verschiedenen Lösungen wiedergewonnene ursprüngliche Aminosäure, wie sie aus dem methylalkohollöslichen Kupfersalz gewonnen war, wurde in einer Menge von ca. 8 g mit überschüssigem heißgesättigten Barytwasser im Autoklaven 20 Stunden auf 180° erhitzt. Nach Fällung des Baryts und Ein-

dampfen der Lösung wurde daraus in Wasser schwach linksdrehende Aminosäure erhalten, die man in üblicher Weise in die Kupfersalze verwandelte.

Die fein pulverisierten trockenen Kupfersalze (ca. 10 g) wurden am Rückflußkühler in einem Rundkolben 8—10 mal mit je $^1/_2$ l 96 proz. Alkohol jeweilig 3 Stunden ausgekocht.

Die gesammelten alkoholischen Extrakte ergaben zur Trockne verdampft 3,7 g Kupfersalz (Kupfersalz I in Äthylalkohol löslich).

Es blieben nach dem Auskochen mit Alkohol 6,1 g Kupfersalz zurück (Kupfersalz II in Äthylalkohol unlöslich).

d - Allo - Isoleucin. Aus dem alkohollöslichen Kupfersalz (Kupfersalz I) wurden 2,7 g roher Aminosäure gewonnen, die zusammen mit 200 g Raffinade in 2 l Leitungswasser gelöst, mit 100 g frischer Preßhefe vergoren wurden. Die Gärung war in 2 Tagen beendet. Die von der Hefe durch Filtration befreite Flüssigkeit wurde nach Abdestillieren des Alkohols mit Kupfercarbonat gekocht, filtriert und das tiefdunkelblaue Filtrat stark eingedampft. Der zurückbleibende blaue Sirup wurde mit Methylalkohol ausgelaugt, von ausgeschiedenen grünlich gefärbten Partikeln abfiltriert und das Filtrat nach Wegkochen des Methylalkohols und Aufnehmen mit Wasser mittels Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit. Beim Eindampfen der wässerigen Lösung und längerem Stehen des resultierenden Sirups schieden sich blättrige Krystalle aus, die abgesaugt und auf Ton gepreßt wurden.

Durch Umkrystallisation aus Alkohol unter vorsichtigem Zusatz von Wasser wurden daraus 0,6 g fast reines d - Allo - Isoleucin gewonnen. Schmelzpunkt im geschlossenen Rohr 280°.

0,1067 g Substanz: 10,1 ccm N (18°, 743 mm).
0,1231 g Substanz: 0,2470 g CO_2, 0,1078 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ 54,72, „ 9,66, „ 10,68.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,2700 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 7,7999 g. Prozentgehalt 3,46. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: — 0,89°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -12{,}92^\circ.$$

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,2646 g Substanz wurden gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 5,6161 g. Prozentgehalt 4,71. Spez. Gewicht 1,094. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −1,84°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -35{,}7^\circ.$$

l-Valin. Das in einer Menge von 6,1 g beim Auskochen mit Äthylalkohol zurückbleibende Kupfersalz (Kupfersalz II) wurde in wässeriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt, und das klare Filtrat, das konzentriert sich optisch als vollständig inaktiv erwies, zur Trockne verdampft. Es wurden so 4,4 g roher Aminosäure gewonnen, die beim Umkrystallisieren 3,5 g Reinausbeute ergaben.

Diese Menge wurde sodann mit 150 g Raffinade und 75 g frischer Preßhefe in 2 l Wasser innerhalb von 2 Tagen vergoren; aus der vergorenen Lösung wurde durch direkte Krystallisation 1,5 g Rohprodukt isoliert, das bei der weiteren Reinigung ca. 1,2 g fast reines l-Valin lieferte. Schmelzpunkt im geschlossenen Rohr 293° unter Schäumen.

Löslichkeit in Wasser. Zur Bestimmung der Löslichkeit wurde die Aminosäure mit einer zur Lösung ungenügenden Menge Wasser bei 23° 20 Stunden geschüttelt. 4,1978 g Lösung enthielten 0,2623 g Substanz. 1 Teil der Aminosäure löst sich also bei 23° in 16 Teilen Wasser (nach E. Fischer[1]) bei 25° in 17,1 Teilen Wasser).

0,1327 g Substanz: 13,1 ccm N (17°, 772 mm).

0,1573 g Substanz: 0,2960 g CO_2, 0,1298 g H_2O.

$C_5H_{11}NO_2$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,97.
Gef. „ 51,31, „ 9,23, „ 11,53.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,2623 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 4,1978 g. Prozentgehalt 6,24. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −0,37°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -6{,}06^\circ.$$

(E. Fischer [l. c.] $[\alpha]_D^{20^\circ} = -6{,}42^\circ$).

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2326, 1906.

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,4182 g Substanz wurden gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 9,0807 g. Prozentgehalt 4,61. Spez.Gewicht 1,094. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: −1,39°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -27{,}62^\circ.$$

(E. Fischer [l. c.] $[\alpha]_D^{20^\circ} = -28{,}40^\circ$.)

ÜBER DIE SPALTUNG EINIGER RACEMISCHER AMINOSÄUREN MITTELS HEFE.

Bei der synthetischen Bereitung chemischer Verbindungen mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom aus solchen, deren Molekül einen symmetrischen Bau besitzt, erhält man stets optisch-inaktive Substanzen, die aus gleichen Teilen einer rechts- und einer linksdrehenden Komponente bestehen, die sogenannten Racemkörper. Da nun in der Natur bis auf sehr seltene Ausnahmen Racemverbindungen nicht vorkommen, sondern immer nur optisch-aktive Substanzen bestimmter Modifikation und Drehungsrichtung, so ist man bei der Synthese natürlich auftretender Substanzen häufig vor die Aufgabe gestellt, die zuerst gewonnenen Racemverbindungen zu spalten, d. h. sie in ihre rechts- und linksdrehende Komponente zu zerlegen.

Die drei Methoden, deren man sich heute allgemein zur Spaltung racemischer Verbindungen bedient, sind im Prinzip die gleichen, die Pasteur[1]) in der Mitte des vorigen Jahrhunderts geschaffen und zuerst auf eine ganze Reihe synthetischer Produkte angewandt hat.

Die erste dieser Methoden besteht in der mechanischen Auslese der krystallographisch verschiedenen Modifikationen, die zweite in der Kombination der Racemkörper mit optisch-aktiven Substanzen zum Zwecke der Differenzierung der Löslichkeitsverhältnisse beider Antipoden, und schließlich die dritte, die sogenannte biologische Methode, die immer nur zu einer Modifikation führen kann, in der Zersetzung der einen Komponente durch die Lebenstätigkeit von Mikroorganismen.

Für die Spaltung racemischer Aminosäuren hat von diesen Pasteurschen Grundmethoden bisher nur die zweite größere

[1]) Ann. chim. **3**, 28, 1850; Ann. **88**, 213, 1853; Compt. rend. **46**, 616, 1858; **51**, 298, 1860.

praktische Bedeutung gewonnen. Diese Methode wird heute allgemein zur Bereitung aktiver Aminosäuren aus synthetischen Produkten nach dem von E. Fischer modifizierten Verfahren angewandt. E. Fischer[1]) hat nämlich gezeigt, daß man beide Komponenten racemischer Aminosäuren in guter Ausbeute getrennt halten kann, wenn man ihre Benzoyl- oder Formylderivate mit Alkaloiden kuppelt und die erhaltenen Salzpaare fraktioniert krystallisiert.

Erst mit Hilfe dieses Verfahrens war es Fischer möglich, das Ausgangsmaterial zu seinen berühmten Synthesen der Polypeptide, die natürlich vorkommenden Aminosäuren, in größeren Mengen künstlich zu bereiten.

Diesem Verfahren gegenüber ist bisher die Anwendung der übrigen Pasteurschen Methoden für die Zerlegung racemischer Aminosäuren fast vollkommen zurückgetreten. Die Methode der Auswahl enantiomorpher Krystalle ist infolge ihrer großen praktischen Schwierigkeiten bisher wohl überhaupt nur beim Asparagin von Piutti[2]) durchgeführt worden. Dagegen hat man früher in mehreren Fällen versucht, die Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Mikroorganismen zu bewirken, allerdings bisher mit sehr geringem Erfolg.

So berichten Engel[3]) von der Asparaginsäure und Menozzi und Appiani[4]) von der Glutaminsäure, daß ihre Racemverbindungen durch Pilzvegetation optisch-aktiv werden. Beim r-Alanin beobachteten E. Fischer[5]) und später Mac Kenzie und Harden[6]), daß Penicillium glaucum und Aspergillus niger in den Lösungen dieser Aminosäure wachsen und dabei das d-Alanin zum Verschwinden bringen. Etwas bessere Ausbeute an dem aktiven Körper erhielten Neuberg und P. Mayer[7]) bei der Einwirkung von Aspergillus niger auf r-Cystin.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2451, 1900; **33**, 2370, 1900; **33**, 2833, 1900; Fischer und Hagenbach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**, 3764, 1901; E. Fischer und Warburg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 3997, 1905.

[2]) Jahrerber. f. Chem. **1886**, 1343; **1887**, 1660.

[3]) Compt. rend. **106**, 1734, 1888.

[4]) Atti R. Ac. dei Lincei, 5. Ser., **1**, 38, 1892.

[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2459, 1899.

[6]) Proc. Chem. Soc. **19**, 48, 1903.

[7]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 508, 1905.

Indes ist die totale Spaltung einer racemischen Aminosäure nach den früher angewandten biologischen Methoden allein E. Schulze und seinen Mitarbeitern[1]), und auch nur in je einem Falle bei dem Leucin, der α-Amino-n-Capronsäure und der Glutaminsäure gelungen, aus deren Lösungen durch Aussaat von Penicillium glaucum der Antipode der natürlich vorkommenden aktiven Verbindung mit dem vollen Drehungswert erhalten werden konnte.

Aber gerade die Schwierigkeiten, unter denen diese Spaltungen verliefen, die umständliche Bereitung einer Nährlösung, das Erfordernis peinlich durchgeführter Sterilisierung, die Tatsache, daß diese Versuche wochen- und oft monatelang dauerten, und auch dann häufig nur zu unvollkommener Spaltung führten, machte es erklärlich, daß die Spaltung racemischer Aminosäuren mittels des biologischen Verfahrens sich bisher nur wenig Eingang in die physiologische Chemie verschafft hat.

Erst das jüngst von F. Ehrlich[2]) auf völlig neuer Grundlage aufgebaute Verfahren zur Vergärung von Aminosäuren mittels Hefe ermöglicht es, die biologische Methode neben der von Fischer geschaffenen für die künstliche Gewinnung optisch-aktiver Aminosäuren erfolgreich aufzunehmen.

Das Prinzip dieses Verfahrens besteht im wesentlichen darin, daß man die racemische Aminosäure in einer Zuckerlösung mit einem großen Überschuß stickstoffarmer Hefe vergären läßt. Während die Hefe den Zucker zu Alkohol und Kohlensäure vergärt, sättigt sie sich hierbei gleichzeitig mit dem Stickstoff vorwiegend der einen Komponente der Aminosäure, die sie zufolge der allgemeinen Gleichung:

$$R \cdot CHNH_2 \cdot COOH + H_2O = R \cdot CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

abbaut, und läßt nach vollständiger Vergärung des Zuckers den größten Teil der anderen Komponente unangegriffen in der Lösung zurück. Diese Methode bietet gegenüber allen anderen

---

[1]) Schulze und Boßhard, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**, 388, 1885; Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 134, 1886; Schulze und Likiernik, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **24**, 671, 1891; E. Schulze, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **26**, 56, 1893; Schulze und Likiernik, Zeitschr. f. physiol. Chem. **17** 523, 1893.

[2]) Biochem. Zeitschr. **1**, 8, 1906.

bisher bekannten biologischen Spaltungsverfahren den großen Vorteil, daß sie jede Bereitung einer Nährlösung überflüssig macht, in sehr kurzer Zeit — gewöhnlich schon in 2—3 Tagen — vollständig verläuft und bei richtiger Abmessung der Mengenverhältnisse von Hefe, Zucker und Aminosäure zur totalen Spaltung der letzteren und zur Gewinnung ihres natürlichen Antipoden führt, dessen Isolierung man in sehr einfacher Weise durch Abfiltrieren der vergorenen Flüssigkeit von der Hefe, Eindampfen und direkte Krystallisation meist in einer Reinausbeute von 60—80% der theoretischen leicht bewerkstelligen kann.

Nach diesem äußerst bequemen Verfahren gelang es F. Ehrlich[1]) bisher reines d-Leucin, l-Alanin und l-Valin darzustellen. Außerdem konnte er durch Zerlegung des Gemisches von d-Isoleucin und d-Alloisoleucin[2]) die große praktische Nutzanwendung dieser Methode erweisen, die namentlich für die Auffindung der alkoholischen Gärung der Aminosäuren durch F. Ehrlich große analytische Bedeutung gewonnen hat.

Allerdings teilt auch die Vergärung der racemischen Aminosäuren mittels Hefe und Zucker mit allen anderen biologischen Spaltungsverfahren den Übelstand, daß man mit ihrer Hilfe nur die der natürlichen entgegengesetzte Modifikation der betreffenden Aminosäure gewinnt, während dabei gerade die für den Physiologen interessanteste, nämlich die natürlich vorkommende Verbindung, der Zerstörung durch die Hefe anheimfällt. Indessen gewinnt die leicht und schnell auszuführende Arbeitsmethode F. Ehrlichs neuerdings eine besondere Bedeutung, nachdem E. Fischer bei seinen Synthesen der Polypeptide gezeigt hat, daß man, auch vom Antipoden einer natürlichen Aminosäure ausgehend, mit Hilfe der Waldenschen Umkehrung[3]) zu Derivaten und Verbindungen gelangen kann, die der natürlich vorkommenden Aminosäure entsprechen, und daß in einzelnen solcher Fälle, z. B. bei der Bereitung des l-Alanins, die Vergärung des Racemkörpers den chemischen Spaltungsmethoden gegenüber zu bevorzugen ist[4]).

Bei dem großen Interesse, das, wie schon erwähnt, die Reingewinnung optisch-aktiver Aminosäuren für die Chemie der Pro-

[1]) Biochem. Zeitschr. **1**, 8.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2538, 1907.
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 489, 1907.
[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 3992, 1906.

teine und die künstliche Bereitung der Polypeptide besitzt, habe ich nun fernerhin versucht, die Methode der Vergärung mittels Hefe und Zucker auf eine Reihe weiterer wichtiger Vertreter racemischer Aminosäuren auszudehnen. Es gelang auf diese Weise, den optischen Antipoden eines wichtigen Abbauproduktes des Eiweißes — des Phenylalanins — in reiner Form, wie es zuerst Fischer durch Spaltung erhalten hat, zu gewinnen, und dann zum ersten Male eine optisch-aktive Modifikation der nicht minder interessanten α-Amino-Phenyl-Essigsäure von der Formel $C_6H_5 \cdot CHNH_2 \cdot COOH$ rein darzustellen und näher zu charakterisieren.

Versuche, das nächst niedrige Homologe des Isoleucins, die α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure von der Formel $\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>\!C \cdot NH_2 \cdot COOH$ in gleicher Weise zu spalten, haben ebenfalls zu einem bisher nicht bekannten aktiven Körper geführt, der vielleicht noch partiell racemisch ist, aber in mehreren Versuchen in optisch-aktiver Form von gleichem Drehungsvermögen isoliert werden konnte.

Die Methode der Vergärung mit Hefe wurde von mir auch auf β-Aminosäuren übertragen, doch wurden dabei aus β-Amino-Buttersäure stets nur inaktive Produkte erhalten, wenn sich auch nachweisen ließ, daß diese Aminosäure durch Hefe angegriffen wird und bei der Vergärung aus der Lösung verschwindet; demnach scheint es also, daß beide Komponenten der β-Amino-Buttersäure gleichmäßig als Stickstoffnahrung für die Hefe dienen können, wenn man nicht annimmt, daß die zuerst entstandene aktive Modifikation sich bei der Weiterverarbeitung wieder racemisiert hat.

Als wichtiges Resultat ergab sich schließlich noch, daß die Hefespaltung mit gutem Erfolg auch auf Oxy-Aminosäuren anwendbar ist. Es ließ sich nämlich durch Vergärung von racemischem Serin mit Hefe und Zucker in ähnlich guter Ausbeute wie beim Alanin das d-Serin gewinnen, das zuerst durch Fischer bekannt geworden ist, so daß auch vielleicht für diese und andere aktive Oxy-Aminosäuren das Gärungsverfahren eine geeignete Darstellungsweise bilden wird.

Für die folgenden Versuche wurde jedesmal frischbezogene obergärige Reinzuchtpreßhefe Rasse XII des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe verwendet.

d-Phenyl-Alanin.

Als Ausgangsmaterial diente racemisches Phenyl-Alanin, das nach der Methode von E. Fischer[1]) aus Benzyl-Bromalonsäure über die β-Phenyl-α-Brompropionsäure durch Erhitzen der letzteren mit wässrigem Ammoniak erhalten war. Das Präparat wurde zur Reinigung aus Wasser mehrmals umkrystallisiert.

10 g dieses synthetischen Phenyl-Alanins wurden zusammen mit 250 g Raffinade in $2^1/_2$ l Leitungswasser unter Erwärmen auf dem Dampfbade gelöst; in die abgekühlte Lösung wurden 100 g frische Preßhefe eingetragen und durch Schütteln emulsionsartig verteilt. Die Gärung setzte nach kurzer Zeit sehr lebhaft ein und war nach zwei Tagen beendet. Nach dem Abfiltrieren der Hefe und dem Abdestillieren des Alkohols, der beim Verdunsten einen rosenähnlichen Geruch (Phenyl-Äthylalkohol)[2]) erkennen ließ, wurde die wässerige Lösung nach Klärung mit Tonerde und Entfärben mit Knochenkohle zur Sirup-Konsistenz eingedampft. Die nach kurzem Stehen sich ausscheidenden Krystalle wurden nach eintägiger Aufbewahrung scharf abgesaugt und auf Ton gepreßt. Aus den Mutterlaugen ließ sich durch nochmaliges Konzentrieren noch eine kleine Menge der Aminosäure gewinnen. Die gesamte Menge des Rohproduktes betrug 3,6 g, das beim Umkrystallisieren aus Wasser 3,2 g reine Aminosäure lieferte.

Für die Analyse und die Bestimmung der optischen Drehung wurde das Präparat nochmals durch Umlösen aus Wasser gereinigt.

0,1517 g Substanz: 0,3640 g CO_2, 0,0922 H_2O.

0,1754 g Substanz: 13,0 ccm N (17,5°, 753 mm),

$C_9H_{11}NO_2$.	Ber. C 65,46	H 6,66	N 8,48.
	Gef. „ 65,50	„ 6,72	„ 8,50.

Spez. Drehung in wässeriger Lösung:

0,2749 g Substanz wurden in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 13,6183 g. Spez. Gewicht 1,0043. Prozentgehalt: 2,01. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: + 1,39°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +34{,}56^\circ.$$

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 3064, 1904.

[2]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1047, 1907.

Spez. Drehung in salzsaurer Lösung:

0,6627 g Substanz wurden in 20proz. Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 18,0245 g. Spez. Gewicht 1,0895. Prozentgehalt 3,48. Im 200 mm - Rohr $\alpha_D^{20°} = +0{,}52°$, folglich

$$[\alpha]_D^{20°} = +6{,}86°.$$

Die durch Vergärung aus rac. Phenyl-Alanin gewonnene Aminosäure ist also reines d-Phenyl-Alanin, da sie in allen ihren Eigenschaften besonders in ihren Drehungswerten vollständig mit der von E. Fischer durch Spaltung der Benzoyl-Verbindungen mittels des Cinchoninsalzes dargestellten d-Komponente übereinstimmt. Fischer[1]) fand nämlich für die Drehung des d-Phenyl-Alanins unter denselben Konzentrationsverhältnissen in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20°} = +35{,}08°$ und in salzsaurer Lösung $[\alpha]_D^{20°} = +7{,}07°$.

Optisch-aktive α-Amino-Phenyl-Essigsäure[2]).

$C_6H_5 \cdot CHNH_2 \cdot CO_2H$.

Die α-Amino-Phenyl-Essigsäure ist bisher nur in der Racemform bekannt. Sie ist zuerst von Stöckenius[3]) aus der Phenyl-Brom-Essigsäure durch Behandlung mit wässerigem Ammoniak erhalten worden. Ihre einfachste Darstellungsweise lehrte Tiemann[4]), der sie aus dem Benzaldehyd durch Einwirkung von Blausäure und Ammoniak und nachfolgender Verseifung bereitete und ihre Eigenschaften und Verbindungen näher beschrieb. Die Aminosäure erscheint besonders interessant wegen ihrer Beziehungen zur Mandelsäure, in welche sie durch Einwirkung von salpetriger Säure übergeführt werden kann. Ein Abbau der Phenyl-Amino-Essigsäure ist auch bei physiologischen Prozessen beobachtet worden. So fand Schotten[5]), daß, wenn man diese Aminosäure einem Hunde verfüttert, sie zum Teil als Mandelsäure in den Harn übergeht. Eine gleiche Desamidierung konnten

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2385—2386, 1900.

[2]) Über die Spaltung der α-Amino-Phenyl-Essigsäure durch Hefe wurde bereits in der Sitzung der Deutschen chemischen Gesellschaft in Berlin am 26. November 1906 vorläufig berichtet.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **11**, 2002, 1878.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **13**, 383, 1880.

[5]) Schotten, Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**, 66.

Tiemann und Friedländer[1]) bei der „Pankreasfäulnis" der Phenyl-Amino-Essigsäure feststellen. Doch berichten diese Forscher nicht, ob die Phenyl-Amino-Essigsäure, die infolge des Ersatzes eines Wasserstoffatoms der Methylengruppe durch die NH_2- Gruppe ein asymmetrisches Kohlenstoffatom besitzt, dabei in aktive Mandelsäure übergegangen ist, und ob die angewandte Racemverbindung asymmetrische Spaltung erfahren hat.

Nachdem nun neuerdings gelegentlich der Arbeiten über die alkoholische Gärung der Aminosäuren[2]) festgestellt war, daß die Hefe die Phenyl-Amino-Essigsäure in Benzylalkohol und Benzaldehyd überzuführen vermag, schien es von großem Interesse, näher zu untersuchen, ob bei der Vergärung eine asymmetrische Spaltung der Aminosäure stattfindet.

Den definitiven Nachweis einer solchen erbringen die folgenden Versuche, durch die zum erstenmal die α-Amino-Phenyl-Essigsäure in optisch aktiver Form, und zwar in einer in wässeriger und salzsaurer Lösung linksdrehenden Modifikation bekannt wird.

Vergärt man nämlich die Phenyl-Amino-Essigsäure mit viel Zucker und Hefe, wobei man wegen der Schwerlöslichkeit der Aminosäure stets eine verhältnismäßig große Menge Zuckerlösung anwenden muß, so verschwindet regelmäßig ungefähr die Hälfte der Aminosäure aus der Lösung, und der nach der Vergärung zurückgewonnene Teil der Verbindung erweist sich jedesmal als optisch aktiv. Je nach der Art der Fraktionierung zeigt indes die wiedererhaltene Substanz von der Bruttozusammensetzung der ursprünglich angewandten ein sehr verschiedenes Drehungsvermögen, was daher rührt, daß bei der Vergärung mit Hefe stets ein relativ großer Teil der racemischen Aminosäure unangegriffen bleibt, und daß dann bei den verschiedenen Operationen des Umkrystallisierens sich in ihrer Zusammensetzung wechselnde Krystallgemische der inaktiven und aktiven Aminosäure bilden. Entsprechend der Schwerlöslichkeit der Racemverbindung in Wasser sind die sich zuerst abscheidenden Fraktionen meist optisch inaktiv oder doch nur von relativ geringer optischer Aktivität. Stark linksdrehende Substanzen waren immer erst aus den am leichtesten löslichen Fraktionen zu ge-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 1969, 1881.

[2]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1047, 1907.

winnen, doch stets nur in geringer Menge und von einem spezifischen Drehungsvermögen, das bei den verschiedenen Versuchen innerhalb weiter Grenzen schwankte. Da es sich zeigte, daß die optisch aktive Aminosäure durch Säuren leicht racemisierbar ist, so wurde, um eine Einwirkung der bei der Gärung entstandenen Säuren zu verhindern, in einzelnen Fällen in der Weise operiert, daß man die vergorene, von der Hefe abfiltrierte Lösung sofort mit Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzte und während des Eindampfens durch Zufügung neuer Ammoniakmengen dauernd schwach alkalisch erhielt. Aber selbst bei dieser Arbeitsweise, die jede Wiederracemisierung der optisch aktiven Aminosäure auszuschließen schien, wurde wieder ein ähnliches Gemisch von racemischer und aktiver Verbindung gewonnen, dessen Zusammensetzung sich auch nicht wesentlich änderte, wenn die einmal vergorene Susbtanz nochmals mit Hefe und Zucker zur Vergärung angesetzt wurde.

Man muß daher annehmen, daß die Phenyl-Amido-Essigsäure im Gegensatz zu den bisher untersuchten Aminosäuren wie Leucin, Alanin usw. sich durch Hefe nicht in dem Sinne spalten läßt, daß vorzugsweise nur die eine Komponente assimiliert und die andere fast unangegriffen zurückbleibt. Vielmehr scheint es, daß die Unterschiede in der Angriffsgeschwindigkeit der beiden optischen Modifikationen dieser Aminosäure durch die Hefe so geringe sind, daß auch bei Vergärung mit sehr viel Hefe und Zucker stets nur ein relativ kleiner Teil der weniger leicht assimilierbaren l-Komponente nach beendeter Gärung überschüssig zurückbleibt.

Immerhin ließ sich nach der Vergärung der racemischen Phenyl-Amido-Essigsäure durch eine zweckentsprechende Anreicherung der leicht löslichen Fraktionen regelmäßig, wenn auch in kleinen Mengen, eine linksdrehende Aminosäure von auffallend hoher optischer Aktivität isolieren. In zwei fast übereinstimmenden Fällen wurde ihre spezifische Drehung zu $[\alpha]_D^{20^\circ} = -140{,}95^\circ$ in 10 proz. Salzsäure, die ihrer Phenyl-Cyanat-Verbindung in alkalischer Lösung zu $[\alpha]_D^{20^\circ} = -129{,}27^\circ$ gefunden. In einem Falle ließ sich sogar eine noch etwas höher drehende Aminosäure abscheiden, sie zeigte nämlich in salzsaurer Lösung $[\alpha]_D^{20^\circ} = -144{,}83^\circ$ und gleichzeitig in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20^\circ} = -90{,}35^\circ$. Die optisch-aktive Aminosäure war in Wasser bedeutend leichter löslich als die racemische und löste sich zum Unterschied von dieser

auch relativ leicht in verdünntem Alkohol. Da indes die racemische Phenyl-Amido-Essigsäure in ihrer Löslichkeit von der optisch aktiven sehr stark beeinflußt und schon bei Gegenwart von geringen Mengen der letzteren viel leichter von Wasser und Alkokol aufgenommen wird, so läßt sich auch nach den obigen Auseinandersetzungen nicht mit Sicherheit angeben, ob die Aminosäure von der bezeichneten Drehung die reine l-Komponente und nicht etwa ein Gemisch derselben mit dem Racemkörper darstellt. Hierüber wird erst die Spaltung der inaktiven Verbindung mittels einer anderen Methode entscheiden können.

Jedenfalls läßt sich schon auf Grund der folgenden Versuche behaupten, daß die hier zum erstenmal beschriebene optisch aktive Phenyl-Amido-Essigsäure von allen bisher bekannt gewordenen Aminosäuren außer dem Cystin das höchste Drehungsvermögen besitzt. Es erscheint dies um so merkwürdiger, als das nächsthöhere Homologe dieser Aminosäure, das Phenyl-Alanin (Phenyl-Amido-Propionsäure) $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot CO_2H$, eine bedeutend geringere Drehung aufweist, nämlich 35,08 in wässeriger und 7,07 in salzsaurer Lösung. Nicht minder beachtenswert ist aber, daß das spezifische Drehungsvermögen der optisch-aktiven Phenyl-Amido-Essigsäure unter fast dieselbe Größenordnung fällt wie dasjenige der ihr chemisch so nahe stehenden Mandelsäure, deren l-Komponente nach Walden[1]) in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = -153°$ dreht. Es soll versucht werden, die optisch-aktive Phenyl-Amido-Essigsäure durch salpetrige Säure in optisch-aktive Mandelsäure überzuführen und auf diese Weise die stereochemischen Beziehungen beider Verbindungen festzustellen. Es dürfte dies namentlich in der Hinsicht von Interesse sein, als nicht ausgeschlossen erscheint, daß die aktive Phenyl-Amido-Essigsäure vielleicht in der Natur vorkommt.

Als Ausgangsmaterial für die verschiedentlich variierten, im folgenden näher beschriebenen Gärversuche diente eine von Kahlbaum-Berlin bezogene Phenyl-Amino-Essigsäure, die in ihren Eigenschaften mit der von Tiemann und anderen Forschern beschriebenen übereinstimmte; sie wurde vor ihrer Verwendung durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt. Die reine Säure schmolz im geschlossenen Rohr unter Schäumen bei 303—305°.

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **17**, 706.

I. 10 g synthetische α-Amino-Phenyl-Essigsäure wurden zusammen mit 350 g Zucker in einem 4 l-Kolben in ungefähr 3 l Wasser durch längeres Erwärmen auf dem Dampfbade gelöst. Das Erhitzen muß gewöhnlich einige Stunden unter häufigem Schütteln fortgesetzt werden, da die Aminosäure von Wasser sehr schwer benetzbar ist und sich darin erst bei längerer Berührung vollständig löst. In die abgekühlte Lösung, aus der infolge ihres reichlichen Zuckergehaltes auch bei längerem Stehen die Aminosäure nicht auskrystallisiert, wurden 150 g frischer Preßhefe eingetragen. Die Gärung setzte scheinbar langsamer ein als bei anderen Aminosäuren, war aber ebenfalls nach zwei Tagen beendet. Nach vollständigem Abfiltrieren und Auswaschen der Hefe wurde die vergorene Flüssigkeit bis zu beginnender Krystallisation eingedampft. Nach zwölfstündigem Stehen wurden die abgeschiedenen Krystalle abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser und Alkohol gewaschen. Rohausbeute 4,6 g. Durch Umkrystallisieren wurden 4 g reine Substanz erhalten, von der eine Lösung von 0,5 g in ungefähr 12 ccm 10 proz. Salzsäure, im 200 mm-Rohr beobachtet, sich als vollkommen inaktiv erwies.

Aus den schwach linksdrehenden Mutterlaugen der ersten Fraktion wurde noch eine zweite leichter lösliche Fraktion gewonnen, die beim Umlösen aus Wasser ca. 1 g reiner linksdrehender Substanz ergab.

0,3661 g Substanz wurden gelöst in 10 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 15,5190 g. Prozentgehalt 2,35. Spez. Gewicht 1,0694. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 5,78° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -111{,}01°.$$

II. Der Versuch wurde mit weniger Substanz bei gleichbleibender Hefe- und Zuckermenge ausgeführt.

Es wurden zusammen vergoren:

5 g dl-Phenyl-Amino-Essigsäure,
350 g Raffinade und
150 g Hefe

in 3 l Wasser innerhalb drei Tagen. Die Vergärung verlief im übrigen wie früher angegeben. Es wurden gewonnen:

1. Fraktion: Rein 1,9 g.

0,3673 g Substanz wurden gelöst in 10 proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 14,4238 g. Prozentgehalt 2,54.

Spez. Gewicht 1,0689. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 2,48° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -45{,}67°.$$

2. Fraktion: Rein 0,45 g.

0,2857 g Substanz wurden gelöst in 10proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 14,5849 g. Prozentgehalt 1,95. Spez. Gewicht 1,0683. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 5,64° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -135{,}4°.$$

III. Gegenüber dem vorigen Versuch wurde nun die Hefemenge gesteigert. Zusammen vergoren wurden:

5 g dl-Phenyl-Amino-Essigsäure,
350 g Raffinade,
200 g Hefe

in 3 l Wasser innerhalb drei Tagen. Es wurden gewonnen:

1. Fraktion: Rein 1,9 g fast inaktiv.

0,3700 g Substanz wurden gelöst in 10proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 6,1751 g. Die Lösung dreht im 1 dcm-Rohr nur −0,24°.

2. Fraktion: Rein 1,1 g.

0,3711 g Substanz wurden gelöst in 10proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,1409 g. Prozentgehalt 3,65. Spez. Gewicht 1,0547. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 8,29° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -107{,}67°.$$

Eine geringere Konzentration der Salzsäure[1]) übt keinen Einfluß auf die spez. Drehung der aktiven salzsauren Phenyl-Amino-Essigsäure aus, wie der folgende Versuch zeigt:

0,1856 g Substanz wurden gelöst in 5proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 9,9648 g. Prozentgehalt 1,86. Spez. Gewicht 1,0506. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 4,20° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -107{,}47°.$$

IV. Die Hefemenge wurde bei diesem Versuch bedeutend herabgesetzt. Zusammen vergoren wurden:

[1]) Vorausgesetzt, daß so viel Salzsäure angewendet wird, wie zur Überführung in das salzsaure Salz erforderlich ist.

10 g dl-Phenyl-Amino-Essigsäure,
350 g Raffinade,
50 g Hefe

in 3 l Wasser innerhalb acht Tagen. Es wurden gewonnen:

1. Fraktion: Rein 3,3 g inaktiv.

2. Fraktion: Rein 0,95 g.

0,3787 g Substanz wurden gelöst in 10proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,2232 g. Prozentgehalt 3,74. Spez. Gewicht 1,0535. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm - Rohr 10,38° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -102{,}01°.$$

3. Fraktion: Rein 0,4 g.

0,2781 g Substanz wurden gelöst in 10proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 9,6196 g. Prozentgehalt 2,89. Spez. Gewicht 1,0533. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm - Rohr 8,46° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -138{,}95°.$$

V. Von früheren Vergärungen herrührende Präparate der aktiven Substanz, die einzeln folgende Drehungswerte besaßen, wurden gesammelt:

Probe 1) $[\alpha]_D^{20°} = -107{,}67°$,
„ 2) „ $= -103{,}41°$,
„ 3) „ $= -127{,}48°$,
„ 4) „ $= -110{,}86°$.

Das Gemisch dieser Proben in einer Menge von ungefähr 3 g wurde in kochendem Wasser suspendiert und unter stetem Sieden so viel Wasser zugegeben, bis gerade Lösung der Aminosäure eingetreten war. Sodann wurde nach kurzem Aufkochen mit Tierkohle filtriert und das Filtrat zwölf Stunden in einem kühlen Raum aufbewahrt. Die ausgeschiedene Aminosäure wurde durch Absaugen entfernt, und nur das klare Filtrat für die weiteren Versuche verwendet. Die Flüssigkeit wurde eingedampft und der Trockenrückstand aus ca. 20proz. Alkohol umkrystallisiert.

Auf diese Weise ließen sich ungefähr 2 g in feinen, farblosen, glänzenden Nädelchen krystallisierende Substanz isolieren, deren Drehung nur sehr wenig höher war, als sie bei Versuch IV be-

obachtet wurde. Der Schmelzpunkt des reinen aktiven Körpers differiert kaum von dem der Racemverbindung. In offener Capillare bei schnellem Erhitzen schmilzt die Substanz bei 293°, in geschlossener bei 303—305° unter Aufschäumen. Zur Analyse wurde die Verbindung bei 110° getrocknet.

0,1722 g Substanz: 0,4021 g CO_2 0,0953 g H_2O.
0,1580 g Substanz: 12,8 ccm N (16°, 747 mm).
$C_8H_9NO_2$. Ber. C 63,57 H 5,96 N 9,27.
Gef. „ 63,71 „ 6,09 „ 9,40.

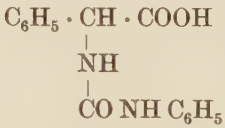
In wässeriger Lösung dreht die Substanz schwächer links als in salzsaurer. Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens wurde die Substanz in 10proz. Salzsäure gelöst, da sie in höher konzentrierter Säure zu schwer löslich ist.

0,3736 g Substanz wurden gelöst in 10proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,1629 g. Prozentgehalt 3,67. Spez. Gewicht 1,0555. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 10,92° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -140{,}95°.$$

Das Chlorhydrat der l-α-Amino-Phenyl-Essigsäure, durch langsames Verdunsten der salzsauren Lösung der Aminosäure erhalten, krystallisiert in derben durchsichtigen Prismen. Im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet schmelzen diese in offener Kapillare erhitzt bei 242—244° unter Zersetzung. Im geschlossenen Röhrchen zeigt sich ein schärferer Schmelzpunkt bei 235°.

Die Phenyl-Cyanat-Verbindung der l-α-Amino-Phenyl-Essigsäure.



0,85 g Substanz wurden in 6 ccm Normalnatronlauge gelöst und die stark abgekühlte Lösung unter Schütteln allmählich mit 1 g Phenylisocyanat versetzt. Von dem sich gegen Ende der Reaktion abscheidenden Phenylharnstoff wurde nach Zusatz von Tierkohle abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure an-

gesäuert. Der dabei anfangs emulsionsartig sich ausscheidende Niederschlag erstarrte in kurzer Zeit zu einem Krystallbrei, der scharf abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus 50 proz. Alkohol umkrystallisiert wurde. Die Phenyl-Cyanat-Verbindung krystallisiert in kleinen farblosen Nädelchen, die, bei 105° getrocknet, bei 168° unter Schäumen schmelzen. Die Verbindung ist in Wasser fast unlöslich, löst sich dagegen leicht in Alkohol.

0,1770 g Substanz: 15,4 ccm N (12°, 755 mm).

$C_{15}H_{14}N_2O_3$. Ber. N 10,76.

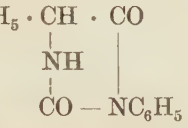
Gef. „ 10,84.

Spez. Drehung in $^n/_2$ Natronlauge.

0,5216 g Substanz gelöst in $^n/_2$ Natronlauge. Gewicht der Lösung 10,1362 g. Prozentgehalt 5,15. Spez. Gewicht 1,0319. $\alpha_D^{20°}$ im 200 mm-Rohr 13,74° nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -129{,}27°.$$

Das Phenyl-Hydantoin der l-α-Amino-Phenyl-Essigsäure (l-Diphenylhydantoin)



wurde durch mehrfaches Einkochen der Phenyl-Cyanat-Verbindung mit viel verdünnter Salzsäure beim Abkühlen der konzentrierten Lösung in Form feiner Nädelchen erhalten. Es wurde zur Reinigung aus Äthylalkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 191°.

0,0965 g Substanz: 9,2 ccm N (13°, 765 mm).

$C_{15}H_{22}N_2O_2$. Ber. N 11,57.

Gef. „ 11,48.

Die Substanz ist in der Kälte in den gewöhnlichen Lösungsmitteln schwer löslich, leichter löst sie sich beim Erwärmen in Wasser, Alkohol, Chloroform und Benzol. Die alkoholische Lösung der reinen Substanz zeigt deutliche Linksdrehung.

VI. Zusammen vergoren wurden:

10 g dl-Phenyl-Amido-Essigsäure,
350 g Rohrzucker und
150 g frische Preßhefe

in 3 l Wasser innerhalb 3 Tagen. Sofort nach beendeter Gärung wurde die Flüssigkeit von der Hefe durch Tonfilter abgesaugt, die klare Lösung durch Zusatz von wässerigem Ammoniak alkalisch gemacht und auf dem Wasserbad zum dünnen Sirup eingedampft, wobei durch stetes Zufügen von neuen Mengen Ammoniak dafür Sorge getragen war, daß die alkalische Reaktion dauernd erhalten blieb. Die ausgeschiedene Krystallmasse wurde nach längerem Stehen abgesaugt, auf Ton völlig getrocknet und aus Wasser und in den leichter löslichen Fraktionen aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute an Rohprodukt 4,25 g. Daraus wurden rein gewonnen:

1. Fraktion: in Wasser schwer löslich 1,6 g. Optisch inaktiv.

2. Fraktion: 0,9 g. Spezifische Drehung in 10proz. Salzsäure

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -114{,}31^\circ.$$

3. Fraktion: 1,1 g. In 10proz. Salzsäure $[\alpha]_D^{20^\circ} = -138{,}64^\circ$.

VII. 3,7 g eines Gemisches aus aktiver und inaktiver Phenyl-Amido-Essigsäure von früheren Vergärungen (Präparate von $[\alpha]_D = -45^\circ$ bis -138°) wurden mit 200 g Zucker in 2 l Wasser gelöst durch 100 g frische Hefe innerhalb 3 Tagen vergoren. Die wieder unter Zusatz von Ammoniak wie bei Versuch VI verarbeitete Lösung lieferte 2,3 g Rohprodukt zurück, aus dem durch Umkrystallisieren aus 30proz. Alkohol 2 g reine Aminosäure in folgenden Fraktionen zu gewinnen war:

1. Fraktion 0,35 g in 30proz. Alkohol unlöslich.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -76{,}97^\circ$$ (in 10proz. Salzsäure ebenso wie folgenden Fraktionen).

2. Fraktion 1,35 g.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -135{,}93^\circ.$$

Es wurde versucht, diese Fraktion durch Auskochen mit verdünntem Alkohol noch weiter zu zerlegen. 1 g wurde mit 300 ccm 50proz. Alkohols am Rückflußkühler gekocht, wobei schnell Lösung eintrat. Über Nacht krystallisierten feine glänzende Nädelchen aus, die abfiltriert und bei 110° getrocknet wurden. 0,55 g. Ihre spezifische Drehung betrug $[\alpha]_D^{20^\circ} = -131{,}92$.

Das alkoholische Filtrat wurde verdampft und der Rückstand noch einmal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. $[\alpha]_D^{20^\circ} = -137{,}95^\circ$.

Durch fraktionierte Krystallisation aus Alkohol ist also keine wesentliche Abtrennung des Racemkörpers von dem aktiven zu erreichen.

3. Fraktion 0,3 g.

Spezifische Drehung in Salzsäure.

0,1655 g Substanz (bei 110° getrocknet) in 10proz. Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,5112 g. Prozentgehalt 3,67. Spez. Gewicht 1,0555. $\alpha_D^{20°}$ im 2 dcm-Rohr −5,61°.

$$[\alpha]_D^{20°} = -144{,}83°.$$

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung.

0,0846 g Substanz zu 14,9807 g in Wasser gelöst. Prozentgehalt 0,57. $\alpha_D^{20°}$ im 2 dcm-Rohr −1,03°.

$$[\alpha]_D^{20°} = -90{,}35°.$$

1 Teil der Substanz erforderte 177 Teile Wasser von 14° zur Lösung.

VIII. Die leichte Racemisierbarkeit der optisch-aktiven Phenyl-Amido-Essigsäure durch Säuren ergibt sich aus folgenden Versuchen:

1. 20 g einer Lösung von ca. 0,4 g aktiver Aminosäure in 10proz. Salzsäure wurden in einem weithalsigen Gläschen einige Zeit auf dem Wasserbade erhitzt, dann abgekühlt und die verdampfte Flüssigkeit wieder zum selben Gewicht aufgefüllt.

(Beobachtungen sämtlich im 200 mm-Rohr.)

Anfangsdrehung . . . . . −10,87°,
Drehung nach zweistündigem Erhitzen . . . . . −10,53°,
„ nach weiterem 2 Stunden langem Erhitzen −10,18°.

2. Eine Lösung von 1 g aktiver Aminosäure in 30 ccm ca. 5prozentiger Salzsäure wurde längere Zeit am Rückflußkühler gekocht.

Anfängliche Drehung . . . . . −4,37°,
Drehung nach dreistündigem Kochen . . . . . −4,23°,
„ nach im ganzen siebenstündigem Kochen . . −4,08°,

Optisch-aktive α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure (Isovalin).

$$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\!\!>\!CNH_2\cdot CO_2H\,.$$

Die α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure, die zum Valin in analogen chemischen Beziehungen steht wie das Isoleucin zum Leucin:

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot \overset{*}{C}HNH_2\cdot CO_2H$$

Leucin

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot \overset{*}{C}HNH_2\cdot CO_2H$$

Valin

$$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\!\!>\!\overset{*}{C}H\cdot \overset{*}{C}HNH_2\cdot CO_2H$$

Isoleucin

$$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\!\!>\!\overset{*}{C}NH_2\cdot CO_2H$$

Isovalin

und die man deswegen auch „Isovalin" nennen könnte, ist bisher ebenfalls nur in der Racemform bekannt.

Ihre Aktivierung hat in mehrfacher Richtung großes Interesse, vor allem aus dem Grunde, weil ihr Vorkommen in der Natur durchaus im Bereich der Möglichkeit liegt. Zwar hat die Durchforschung der Leucinfraktion des Eiweißes[1]), in der man die Gegenwart dieser Aminosäure zuerst vermuten könnte, bisher keine Anhaltspunkte für ihr Vorhandensein gegeben. Indes ist zu berücksichtigen, daß das Isovalin selbst und in seinen Derivaten derartig leicht löslich und auch augenscheinlich leicht racemisierbar ist, daß es vielleicht infolge dieser Eigenschaften und ferner seiner Fähigkeit, mit andern Aminosäuren Mischkrystalle zu bilden, allen Isolierungsversuchen bis jetzt entgangen ist. Für seine Existenz als Eiweißspaltungsprodukt könnten in gewissem Sinne die interessanten Befunde C. Neubergs und Rosenbergs[2]) sprechen, die neuerdings gezeigt haben, daß bei der Fäulnis von Casein und Leim sich optisch-aktive Valeriansäure bildet, deren Entstehungsmöglichkeit aus α-Amino-Methyl-Essigsäure gemäß dem Schema

$$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\!\!>\!CNH_2\cdot COOH \longrightarrow \begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CO_2H$$

sie diskutieren. Doch kann man hier ebenso gut annehmen, wie auch die genannten Autoren andeuten, daß die optisch-aktive

---

[1]) Siehe die vorstehende Mitteilung.

[2]) C. Neuberg und E. Rosenberg, Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. vom 16. Mai 1907. Biochem. Zeitschr. 7, 178, 1907.

Valeriansäure sich durch komplizierteren Abbau aus dem Isoleucin (ev. durch die Wirkung anderer Pilze oder Bakterien vor der eigentlichen Fäulnis) gebildet hat, eine Möglichkeit, auf die schon früher an anderer Stelle[1]) hingewiesen wurde. Es ließe sich außerdem noch einwenden, daß ein Gehalt namentlich der pflanzlichen Eiweißstoffe an Isovalin sich vor allem im Fuselöl durch das Vorhandensein von optisch-aktivem sekundären Butylalkohol hätte bemerkbar machen müssen, entsprechend der früher für die alkoholische Gärung der Aminosäuren[2]) allgemein entwickelten Gleichung:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>\!CNH_2 \cdot CO_2H + H_2O = \begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>\!CHOH + CO_2 + NH_3 .$$

Aber auch hier hat vielleicht nur die große Schwierigkeit, diesen Alkohol, der sich ebenfalls sehr leicht racemisiert[3]), vom Isobutyl- oder anderen Alkoholen naheliegender Siedepunkte zu trennen, seine Erkennung und Isolierung verhindert.

Wie die nachstehend beschriebenen Untersuchungen zeigen, gelingt es durch partielle Vergärung der racemischen α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure mit Hefe eine bisher unbekannte optisch-aktive, in wässeriger und salzsaurer Lösung linksdrehende Modifikation zu gewinnen, die also möglicherweise den optischen Antipoden eines natürlich vorkommenden d-Isovalins bildet. Ob die im folgenden zum erstenmal beschriebene aktive Verbindung die l-Komponente der α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure mit dem vollen Drehungswert darstellt und nicht etwa partiell racemisiert ist, ließ sich nicht mit Sicherheit entscheiden, da ein Vergleich mit einer anderen Spaltungsmethode bisher nicht möglich war. Bei einer sehr großen Anzahl unter allen möglichen Variationen der Mengenverhältnisse von Aminosäure, Zucker und Hefe durchgeführter Gärversuche verschwand stets ein beträchtlicher Teil der Aminosäure, die zurückbleibende optisch-aktive Substanz besaß aber ein sehr wechselndes Drehungsvermögen, wenn die Aufarbeitung der Lösungen in der bisher üblichen Weise geschah. Präparate von maximaler Drehung ließen sich erst durch Ein-

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 2547, 1907.

[2]) F. Ehrlich, Biochem. Zeitschr. **1**, 8; **2**, 52, 1906. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1027, 1907.

[3]) R. Meth, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 695, 1907.

dampfen der frisch vergorenen Flüssigkeiten unter Zusatz von Ammoniak gewinnen.

Das aktive Isovalin zeigt merkwürdigerweise in wässeriger Lösung ein höheres spezifisches Drehungsvermögen als in salzsaurer Lösung. Als höchste Drehung wurde bisher beobachtet in Wasser $[\alpha]_D^{20°} = -9{,}10°$ und in 20 proz. Salzsäure $[\alpha]_D^{20°} = -6{,}11°$. Die aktive Aminosäure ist ebenso wie die inaktive in Wasser und in Alkohol (in Konzentrationen von 70% abwärts) sehr leicht löslich. Ihr Kupfersalz löst sich leicht in Methyl- und Äthylalkohol.

Ihrer Konstitution entsprechend ist die optisch-aktive α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure offenbar sehr leicht racemisierbar. Besonders die freie Aminosäure scheint in dieser Hinsicht sehr empfindlich zu sein und sich häufig schon beim Kochen ihrer wässerigen oder alkoholischen Lösung zum Teil in die Racemverbindung umzuwandeln. Das geht unter anderm schon daraus hervor, daß aus den alkoholischen Filtraten des höchstdrehenden Isovalins immer nur schwächer drehende und oft sogar inaktive Fraktionen beim Eindampfen abgeschieden werden konnten. Dagegen erwies sich das salzsaure Salz der Aminosäure in seiner Aktivität als viel beständiger.

In Übereinstimmung mit den früheren Erfahrungen über die alkoholische Gärung der Aminosäuren ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß sich bei der Hefegärung des Isovalins entsprechend der obigen Gleichung optisch-aktiver sekundärer Butylalkohol von der Formel $\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>\!CHOH$ gebildet hat. Seine Isolierung aus den nach der Vergärung abdestillierten Flüssigkeiten haben sich indes bisher unüberwindliche Schwierigkeiten entgegengestellt, die im wesentlichen darin bestanden, daß die Abscheidung relativ so geringer Mengen des sekundären Butylalkohols von den großen Mengen Äthylalkohol und sein Nachweis neben dem bei diesen Gärversuchen aus autolysierter Hefe stets entstehenden linksdrehenden Amylalkohol unmöglich war. Vielleicht läßt sich die Gewinnung von sekundärem Butylalkohol später einmal durch Vergärung von sehr großen Quantitäten Isovalin durchführen.

Als Ausgangsmaterial für die Vergärung diente reine racemische α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure, die aus dem Methyl-Äthyl-

Keton durch Anlagerung von Blausäure und Ammoniak und Verseifung gewonnen war. Die zuerst von Slimmer[1]) angegebene Darstellungsweise der Aminosäure wurde in einigen Punkten wie folgt abgeändert:

In einer Lösung von 100 g Methyl-Äthyl-Keton in 800 ccm Äther wurden 100 g fein gepulvertes trockenes Cyankali suspendiert und hierzu unter stetem Schütteln und starker Kühlung aus einer Bürette langsam 111 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 zugetropft. Nach beendeter Reaktion blieb das Ganze einige Zeit stehen, dann wurde die ätherische Lösung vom gebildeten Kaliumchlorid abgegossen und letzteres mehrmals mit Äther nachgespült. Nach Vertreiben des Äthers im Vakuum bei ungefähr 30° wurde die zurückbleibende hellgelbe Flüssigkeit mit 240 ccm 10proz. alkoholischen Ammoniak vermischt und im eisernen Autoklaven 5 Stunden auf 50—60° erhitzt. Die resultierende Flüssigkeit wurde vorsichtig mit 100 ccm konzentrierter Salzsäure unter Kühlung versetzt, einige Zeit bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt und nach Zufügung eines gleichen Volumens Salzsäure zunächst auf dem Dampfbade zur Vertreibung des Alkohols erhitzt. Nach mehrmaligem Einkochen mit frisch zugesetzter Salzsäure wurde die Lösung durch Eindampfen im Vakuum von dem größten Teil der Salzsäure befreit und schließlich unter vermindertem Druck bei ungefähr 50° vollständig eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen, vom ungelöst bleibenden Chlorammon abfiltriert und das aus der alkoholischen Lösung beim Verdampfen des Alkohols im Vakuum gewonnene Krystallgemisch in viel Wasser gelöst. Darauf wurde zur Entfernung des Chlors mit Bleioxyd gekocht, aus dem Filtrat mit Schwefelwasserstoff das gelöste Blei gefällt und die schließlich erhaltene klare Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Es hinterblieben 82 g schwach gelb gefärbtes Rohprodukt, das zur weiteren Reinigung aus heißgesättigter wässeriger Lösung mit absolutem Alkohol gefällt wurde. Ausbeute an reiner α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure 77 g.

Von den ungefähr zwanzig zuerst vergeblich mit vielfachen Variationen angestellten Gärversuchen seien im folgenden nur drei ausführlich beschrieben, bei denen die aktive Aminosäure jedesmal mit derselben geringen Drehung erhalten wurde.

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 406, 1902.

Es wurden angesetzt:

I. 7 g α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure,
200 g Zucker,
60 g Hefe
in 2 l Wasser.

Dauer der Gärung $3^1/_2$ Tage. Rohausbeute: 4,1 g; Reinausbeute: 1,85 g.

II. 10 g α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure,
300 g Zucker,
150 g Hefe
in $2^1/_2$ l Wasser.

Dauer der Gärung 2 Tage. Rohausbeute: 4,4 g; Reinausbeute: 3,25 g.

III. 10 g α-Amino-Methyl-Äthyl-Essigsäure,
300 g Zucker,
200 g Hefe
in $2^1/_2$ l Wasser.

Dauer der Gärung 2 Tage. Rohausbeute: 3,8 g; Reinausbeute 2,4 g.

Die Verarbeitung der vergorenen Flüssigkeiten erfolgte allgemein wie früher angegeben wurde. Versuch II wurde nur dahin abgeändert, daß die von der Hefe abfiltrierte Lösung vor dem Eindampfen zur Neutralisation mit der aus der Titration berechneten Menge $^n/_{10}$ NaOH versetzt war. Beim III. Versuch wurde die vergorene hefefreie Flüssigkeit nach dem Abdestillieren des Alkohols mit Kupfercarbonat gekocht, filtriert und auf dem Wasserbade scharf eingedampft. Der zurückbleibende grünblaue Sirup wurde mit Methylalkohol ausgezogen. Aus der methylalkoholischen Lösung wurde der Alkohol abgedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und aus der wässerigen Lösung das Kupfer mit Schwefelwasserstoff gefällt. Das Filtrat ergab ähnlich wie bei den andern Versuchen beim Konzentrieren einen Sirup, aus dem sich nach kurzem Stehen die Aminosäure fein krystallinisch abschied. Sie wurde daraus durch Absaugen, Abpressen auf Ton und Umlösen aus Alkohol rein gewonnen.

Bei den drei erwähnten Versuchen ließ sich eine aktive Aminosäure isolieren, die, bei 110° getrocknet, jedesmal folgende Drehungswerte zeigte:

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,6 g Substanz wurden gelöst in 12 ccm Wasser. $c = 5$. Im 2 dcm-Rohr $\alpha_D^{20°} = 0{,}50°$ nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -5{,}00°.$$

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,3793 g Substanz wurden gelöst in 20 proz. Salzsäure Gesamtgewicht der Lösung 10,3409 g. Prozentgehalt 3,66.

Im 2 dcm-Rohr $\alpha_D^{20°} = 0{,}29°$ nach links:

$$[\alpha]_D^{20°} = -3{,}6°.$$

Eine Aminosäure von beträchtlich höherem Drehungsvermögen wurde erst nach folgendem Verfahren erhalten:

9 g Isovalin wurden zusammen mit 300 g Zucker, in $2^1/_4$ l Wasser gelöst, durch 150 g frische Hefe vergoren. Dauer der Gärung 3 Tage. Die abgesaugte Lösung wurde, wie vorher bei der Phenyl-Amido-Essigsäure geschildert, unter stetem Zusatz von wässerigem Ammoniak, so daß eine schwach alkalische Reaktion gegen Lackmus dauernd erhalten blieb, vorsichtig zum Sirup eingedampft. Die über Nacht auskrystallisierte Substanz wurde abgesaugt und auf Ton von der Mutterlauge möglichst vollständig befreit. Das in einer Menge von 4,45 g erhaltene Rohprodukt gab beim Umkrystallisieren aus Alkohol unter tropfenweisem Zusatz von Wasser in vier Fraktionen 3,54 g reine Aminosäure, die sich in Wasser und verdünntem Alkohol sehr leicht löste.

1. Fraktion 1,47 g. Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1682 g Sbst.: 0,3183 g CO_2, 0,1473 g H_2O;
0,1655 g Sbst.: 17,1 ccm N (16°, 748 mm).

$C_5H_{11}NO_2$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,95.
Gef. „ 51,42, „ 9,69, „ 12,01.

Die Fraktion besaß die höchste bisher beobachtete Drehung.

Spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,5 g Substanz gelöst in 10 ccm Wasser. $c = 5$. $\alpha_D^{20°} = 0{,}91°$ nach links im 2 dcm-Rohr.

$$[\alpha]_D^{20°} = -9{,}10°.$$

Spezifische Drehung in salzsaurer Lösung:

0,3796 g Substanz gelöst in 20proz. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 10,3500g. Prozentgehalt 3,67. Spez. Gew. 1,0943. $\alpha_D^{20°} = 0{,}48$ nach links im 2 dcm-Rohr.

$$[\alpha]_D^{20°} = -6{,}11°.$$

2. Fraktion 1,17 g.
   In Wasser $[\alpha]_D^{20°} = -2{,}4°$.
3. Fraktion 0,3 g.
   In Wasser $[\alpha]_D^{20°} = -7{,}77°$.
4. Fraktion 0,6 g.
   In Wasser $[\alpha]_D^{20°} = -1{,}0°$.

Eine Lösung der aktiven Aminosäure in 20proz. Salzsäure zeigte auch nach zehnstündigem Kochen am Rückflußkühler keine wahrnehmbare Drehungsverminderung gegenüber der Anfangsdrehung.

Versuch zur Spaltung der β-Amino-n-Buttersäure.

Über die Einwirkung verschiedener Schimmelpilze auf β-Amino-Buttersäure berichtet bisher nur O. Emmerling[1]), der jedoch bei keinem seiner Versuche ein Wachstum dieser Mikroorganismen feststellen konnte.

Da es von großem Interesse war zu untersuchen, ob die Hefe auch β-Aminosäuren angreift, wurden die folgenden Versuche unternommen in der Hoffnung, dabei eine asymmetrische Spaltung der β-Amino-Buttersäure erzielen zu können. Der Ausfall dieser Versuche hat gezeigt, daß bei der Vergärung der β-Amino-Buttersäure mit Zucker und Hefe aus der Lösung Stickstoff verschwindet, und daß dementsprechend jedesmal nur ein geringer Teil β-Aminosäure zurückgewonnen wird, so daß man zu der Annahme genötigt ist, daß die Hefe auch diese Aminosäure anzugreifen und für den Aufbau ihres Körpereiweißes zu verwenden vermag. Indes erwies sich die wieder zurückgewonnene Säure in zwei Fällen sowohl in wässeriger wie in salzsaurer Lösung als optisch vollkommen inaktiv. Vorausgesetzt, daß nicht etwa während des Versuches eine Wiederracemisierung stattgefunden

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 2289, 1902.

hat, so wäre demnach ein symmetrischer Abbau der Aminosäure bei der Gärung erfolgt. Für diese Ansicht müßten allerdings noch weitere Beweise beigebracht werden.

Als Ausgangsmateral diente reine β-Amino-Buttersäure, die nach dem Verfahren von Engel[1]) aus der Crotonsäure durch Behandlung mit wässerigem Ammoniak dargestellt und durch mehrfache Umkrystallisation gereinigt war. Ihre Konstitution als die einer β-Amino-n-Buttersäure haben bekanntlich Fischer und Roeder[2]) sicher gestellt.

I. 10 g β-Amino-Buttersäure wurden zusammen mit 200 g Zucker in 2 l Wasser gelöst und mit 200 g frischer Preßhefe vergoren. Nach 2 Tagen war die Gärung beendet. Die abfiltrierte hefefreie Flüssigkeit wurde nach Abdestillation des Alkohols mit Kupfercarbonat gekocht und die Kupferlösung zum Sirup eingeengt, der mit Methylalkohol ausgelaugt wurde. Aus dem Filtrat wurde der Alkohol abgedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, das Kupfer mit Schwefelwasserstoff gefällt, das Filtrat vom Schwefelkupfer mit Tierkohle mehrmals behandelt, wieder mit überschüssigem Kupfercarbonat gekocht und die schließlich erhaltene Lösung des Kupfersalzes auf dem Wasserbade vollständig eingedampft. Nach mehrtägigem Stehen krystallisierte aus dem rückständigen Sirup ein feinblättriges blaues Kupfersalz aus, das nach beendeter Krystallisation von der nur noch grünlich gefärbten Mutterlauge durch Absaugen und Pressen auf Ton befreit wurde. Auf diese Weise ließen sich 2,2 g Kupfersalz gewinnen. Das reine Salz wurde in wässeriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus dem Filtrat des Schwefelkupfers krystallisierten nach längerem Stehen beim Reiben mit dem Glasstab ungefähr 0,6 g Aminosäure aus, die, in konzentrierter wässeriger und salzsaurer Lösung beobachtet, keine Spur optischer Drehung zeigte.

II. Vergoren wurde eine Lösung von 8 g β-Amino-Buttersäure und 200 g Zucker in $2^1/_2$ l Wasser mit 100 g Hefe. Die Aufarbeitung der nach 2 Tagen vollständig vergorenen Flüssigkeit geschah in der oben angegebenen Weise, nur wurde diesmal die Hefe besonders gründlich ausgewaschen und die Lösung

---

[1]) Bull. Soc. Chim. **50**, 102.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**, 3755, 1901.

nur einmal mit Tierkohle gereinigt. Es wurden 1,4 g trockenes Kupfersalz gewonnen. Die daraus in einer Menge von 0,45 g isolierte Aminosäure erwies sich ebenfalls als vollkommen inaktiv.

Um festzustellen, ob wirklich bei der Gärung der Stickstoff aus der Lösung verschwunden war, wurden sämtliche bei der Aufarbeitung des Kupfersalzes resultierenden Flüssigkeiten und Mutterlaugen auf das sorgfältigste gesammelt, nach Ansäuern mit Schwefelsäure eingedampft und wieder zu 500 ccm genau aufgefüllt. 100 ccm der so erhaltenen Flüssigkeit verbrauchten eingedampft und nach Kjeldahl verbrannt 41,6 ccm $^n/_5$ Natronlauge. Hieraus berechnet sich für das gesamte Filtrat von der Hefe, ausgenommen die 1,4 g Kupfersalz, ein Stickstoffgehalt von 0,5824 g.

Diese Stickstoffmenge würde theoretisch 4,3 g Amino-Buttersäure entsprechen. Addiert man hierzu die in Form ihres Kupfersalzes wiedergewonnene Menge der Aminosäure von rund 1,1 g, so ergibt sich folgende Bilanz der Vergärung der Amino-Buttersäure:

Angewandt . . . . . = 8,0 g Amino-Buttersäure.
Aus d. vergor. Lös. zurückgew.:
4,3 g + 1,1 g = 5,4 g.
Folglich vergor. resp. von d. Hefe aufgenommen = 2,6 g Amino-Buttersäure.

Wie sich indes bei dem ersten Versuch durch verschiedene Reaktionen feststellen ließ, sind während der Vergärung Stickstoffsubstanzen aus der Hefe in Lösung gegangen, ähnlich wie das schon früher bei der Leucingärung[1]) beobachtet ist. Die Menge der von der Hefe assimilierten β-Amino-Buttersäure dürfte daher noch beträchtlich mehr als 2,6 g betragen.

d-Serin.

Das Serin, das von Cramer entdeckt und von Fischer und seinen Mitarbeitern[2]) als ein regelmäßiges Spaltprodukt der Proteine gefunden wurde, war bis vor kurzem nur in seiner inaktiven Form bekannt. Erst E. Fischer und Jacobs[3]) ist die

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1027, 1907.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 536, 1906.
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2942, 1906.

Spaltung des racemischen Serins mittels der Alkaloidsalze seiner p-Nitrobenzoylverbindung gelungen, nachdem E. Fischer schon vor längerer Zeit darauf hingewiesen hatte, daß das Serin wahrscheinlich aktiv in den Eiweißstoffen vorhanden ist und bei der Hydrolyse racemisiert wird. Gelegentlich dieser ersten Spaltung ließ sich auch indirekt der Beweis erbringen, daß die natürliche in den Proteinen vorkommende Form das l-Serin ist, da Fischer und Jacobs das von ihnen zuerst gewonnene l-Serin mit Hilfe des Esters in sein Anhydrid verwandeln konnten, welches sich mit einem bei der Hydrolyse des Seidenfibroins isolierten Körper als identisch erwies. Neuerdings ist dann schließlich E. Fischer[1]) die direkte Gewinnung des aktiven Serins aus den Spaltprodukten der Seide mit Salzsäure gelungen.

Der folgende Versuch kann indirekt als ein weiterer Beweis dafür gelten, daß das l-Serin die natürlich vorkommende Form dieser Aminosäure ist, da die Hefe, die stets die natürliche Komponente eines Racemkörpers bevorzugt, racemisches Serin bei der beschriebenen Vergärung asymmetrisch gespalten und dabei reines d-Serin zurückgelassen hat. Außer einer sehr bequemen Gewinnungsmethode des optischen Antipoden des natürlichen Serins ist damit auch zum ersten Male ein Beispiel gegeben, daß die Hefepilze Oxyaminosäuren zu vergären vermögen, die sie jedenfalls ähnlich wie die Aminosäuren zu Alkoholen zu Glykolen abbauen. Bei der Vergärung des Serins müßte demnach entsprechend der Gleichung

$$CH_2OH \cdot CHNH_2 \cdot CO_2H = CH_2OH \cdot CH_2OH + NH_3 + CO_2$$

Äthylenglykol entstehen, worüber später Näheres berichtet werden soll.

Als Ausgangsmaterial diente nach dem Verfahren von Leuchs und Geiger[2]) synthetisch gewonnenes Serin. Aus 100 g Chloracetal wurden 20,3 g reine Aminosäure erhalten.

10 g reines dl-Serin wurden zusammen mit 300 g Zucker in 3 l Wasser gelöst und die Lösung mit 200 g Hefe versetzt. Die Gärung setzte sofort sehr heftig ein und verlief sehr stürmisch innerhalb anderthalb Tagen. Die abfiltrierte zucker- und hefefreie Lösung wurde unter vermindertem Druck bis auf ein kleines Volumen

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1501, 1907.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2644, 1906.

eingeengt und nach Behandlung mit Tierkohle auf dem Wasserbade vorsichtig zum Sirup verdampft. Nach zwölfstündigem Stehen unter starker Kühlung mit Eis und häufigem Reiben trübte sich der Sirup allmählich und schied schließlich einen feinen Krystallbrei ab. Dieser wurde scharf abgesaugt und auf Ton gepreßt, wobei ein schneeweißes Pulver in einer Menge von 2,8 g zurückblieb. Das Rohprodukt wurde in wenig Wasser gelöst und unter schwachem Erwärmen mit Tierkohle gereinigt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingeengt und die konzentrierte Lösung mit absolutem Alkohol bis gerade zur beginnenden Abscheidung der Aminosäure versetzt. Nach zwölfstündigem Stehen unter starker Kühlung krystallisierte das Serin in feinen Nadeln aus, die abgesaugt, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

Auf diese Weise wurden 2,5 g reines d-Serin gewonnen.

Die trockene Substanz, im Capillarrohr schnell erhitzt, wird bei ca. 205° braun und schmilzt unter Aufschäumen bei 223—224° (Fischer und Jacobs 223° [korr. 228°]).

Die aktive Substanz schmeckt bedeutend süßer als die inaktive, wie auch Fischer und Jacobs beobachtet haben.

0,1762 g Substanz: 0,2210 g CO_2, 0,1045 g H_2O;

0,1638 g Substanz: 18,1 ccm N (16°, 769 mm).

$C_3H_7NO_2$. Ber. C 34,28, H 6,73, N 13,33.
Gef. „ 34,24, „ 6,58, „ 13,59.

Spez. Drehung in wässeriger Lösung:

1,3999 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 14,0315. Spez. Gewicht 1,0414. Prozentgehalt 9,97. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: 1,38° nach rechts.

$[\alpha]_D^{20°} = +6{,}67°$ (E. Fischer und Jacobs +6,87°).

Spez. Drehung in salzsaurer Lösung:

0,5009 Substanz wurden gelöst in 5 ccm n-Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 5,6152 g. Spez. Gewicht 1,0465. Prozentgehalt 8,92. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: 1,32° nach links.

$[\alpha]_D^{20°} = -14{,}14°$ (E. Fischer und Jacobs $[\alpha]_D^{20°} = -14{,}32°$).

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Zuckerindustrie zu Berlin auf Anregung und unter Leitung des Herrn Privatdozent Dr. F. Ehrlich angefertigt. Es ist mir Bedürfnis, Herrn Dr. Ehrlich meinen besonderen Dank für seine wertvollen Ratschläge und seine freundliche Unterstützung auszusprechen.

Auch verfehle ich nicht, dem Vorstand des Instituts, Herrn Prof. Dr. A. Herzfeld, für sein geneigtes Entgegenkommen verbindlichst zu danken.

Ferner sei es mir auch an dieser Stelle gestattet, meinem hochgeehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. Michaelis zu Rostock, für sein mir bewiesenes Wohlwollen ganz ergebenen Dank auszudrücken.

Lebenslauf.

Am 29. Juni 1879 wurde ich, Adolf Wendel, zu Wegeleben bei Halberstadt als Sohn des vereidigten Handelschemikers Dr. phil. O. Wendel geboren. Den Schulunterricht genoß ich zunächst auf dem Gymnasium des Klosters U. L. Fr., dann auf dem Königlichen Domgymnasium zu Magdeburg, das ich mit dem Zeugnis der Reife verließ. Im Herbst 1900 bezog ich die Universität München, um Chemie zu studieren, und genügte dort gleichzeitig meiner Militärpflicht als Einj.-Freiwilliger. Meine Studien setzte ich zuerst in Jena, dann an der techn. Hochschule zu Karlsruhe i. B. fort, wo ich das Verbandsexamen und die Vorprüfung für Nahrungsmittelchemie bestand. Hierauf besuchte ich die Universität Berlin und beendete meine Studien an der Universität in Rostock.